



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE TUBERCULOSE
BOVINA EM PORTUGAL**

Joana Sofia Silva Baptista Rafael

Orientação:

Prof. Doutora Elsa Leclerc Duarte

Prof. Doutor Telmo Pina Nunes

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação de natureza científica

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE TUBERCULOSE
BOVINA EM PORTUGAL**

Joana Sofia Silva Baptista Rafael

Orientação:

Prof. Doutora Elsa Leclerc Duarte

Prof. Doutor Telmo Pina Nunes

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação de natureza científica

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

*“Agir, eis a inteligência verdadeira.
Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

No culminar desta etapa urge a necessidade de agradecer a todos os intervenientes assinalando os que mais se destacaram.

Ao meu orientador, Professor Telmo Nunes pelos seus enormes ensinamentos, palavra motivacionais e grande disponibilidade.

À minha orientadora, Professora Elsa Leclerc que sempre se prontificou a ajudar-me em que situação fosse.

À Professora Yolanda Vaz que propôs o tema desta dissertação, assim como a DGAV que gentilmente cedeu os dados do SNIRA.

À Doutora Ana Botelho pela sua enorme disponibilidade em me receber no LNIV, Doutora Ana Canto e Ana Reis, pela incansável paciência e ensino dos protocolos de Spoliotyping e Doutora Teresa Albuquerque por me ceder as bases de dados do LNIV.

Ao Sr. Engenheiro Rui Pombo e ICNF que com prontidão me enviaram os dados.

À minha mãe pelo apoio incondicional que me dedicou durante estes anos, sem ela todo este caminho teria sido muito sinuoso.

Ao meu pai e família que acompanharam o meu percurso e me apoiaram.

Aos meus amigos de Almeirim cuja a amizade e companheirismo, estiveram sempre presentes quer na minha vida pessoal quer na minha vida escolar e que hoje são um exemplo de sucesso profissional.

Aos meus amigos de Évora, em especial à Rita Teles, Mónica Nunes e Joana Tavares, com quem quinhoei bons momentos.

Resumo

A tuberculose bovina é uma zoonose com grande impacto económico e na saúde, originada pelo *Mycobacterium bovis*. Neste estudo foi realizado uma análise a 206 isolados correspondentes aos focos de bTB em bovinos e silváticos nos anos 2013 e 2014, relacionando a proximidade genética, a distância euclidiana e a proximidade de trocas comerciais. Verificou-se que os padrões mais comuns de *spoligotypings* foram o SB1174, SB0122 e SB1264. A distancia euclidiana entre focos de bTB em zonas de caça é muito mais próxima do que entre as explorações.

Na análise da rede de trocas comerciais entre explorações de bovinos, foi possível observar uma rede com uma grande quantidade de intervenientes e com ligações comerciais heterogenias. Foi possível observar através dos indicadores de centralidade que explorações com focos de bTB apresentam maior influência na rede. Rastreou-se cronologicamente as trocas comerciais de explorações, e verificou-se casos particulares de focos de bTB, com ligações diretas entre si e o mesmo padrão de spoligotyping.

Palavras-chave: Tuberculose bovina; *Mycobacterium bovis*; Spoligotyping; Epidemiologia; Análise de redes sociais;

Abstract – Epidemiological study of bovine tuberculosis in Portugal

Bovine tuberculosis is a zoonosis with huge economic and health impact, caused by *Mycobacterium bovis*. In this study, we analyzed 206 samples corresponding to the outbreaks of bTB in cattle and wild species in the years 2013 and 2014, relating the genetic proximity, the euclidean distance and the proximity of trade. The most common patterns of spoligotypings found were SB1174, SB0122 and SB1264. The euclidean distance between bTB outbreaks in hunting areas is much closer to cattle farms.

In the analysis of the trade network between cattle farms, it was possible to observe a network with a large number of actors and with heterogeneous commercial links. It was possible to observe through the centrality indicators that farms with bTB outbreaks have vast influence on the network. Farms trading was chronologically traced, and there were particular cases of bTB outbreaks, with direct links to each other and the same spoligotyping pattern.

Keywords: Bovine tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; Spoligotyping; Epidemiology; social network analysis;

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT – EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF BOVINE TUBERCULOSIS IN PORTUGAL.....	III
ÍNDICE GERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1 PARTICULARIDADES DO GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	1
2 COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	3
3 FILOGENIA DO COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	6
4 TUBERCULOSE BOVINA	8
4.1 INTRODUÇÃO	8
4.2 MEIOS DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO	9
4.3 PATOGENIA	10
4.4 RESPOSTA IMUNE E LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	11
4.5 DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE BOVINA.....	13
4.5.1 Métodos de diagnóstico <i>in vivo</i>	13
4.5.1.1 Prova da Intradermotuberculinização comparada (IDTC).....	13
4.5.1.2 Teste Interferão- γ	14
4.5.2 Métodos de diagnóstico bacteriológicos	15
4.5.3 Métodos moleculares de genotipagem	16
4.5.3.1 <i>Spoligotyping</i>	17
5 EPIDEMIOLOGIA.....	20
5.1 PANORAMA GLOBAL DA BTB	20
5.1.1 Tuberculose Bovina na União Europeia	22
5.1.2 Tuberculose Bovina em Portugal.....	24
6 ANÁLISE DE REDES SOCIAIS: REDE DE MOVIMENTOS DE BOVINOS	28
CAPÍTULO 2: TRABALHO EXPERIMENTAL	33
1 OBJETIVOS	33
1.1 OBJETIVOS GERAIS	33
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 INTRODUÇÃO	34
2.2 <i>SPOLIGOTYPING</i>	34
2.2.1 Amostra:.....	34
2.2.2 Tratamento de dados:	35
2.3 GEORREFERENCIAÇÃO	36
2.3.1 Dados:.....	36

2.3.2	<i>Tratamento de dados:</i>	36
2.4	REDE DE MOVIMENTOS DE BOVINOS	37
2.4.1	<i>Dados:</i>	37
2.4.2	<i>Construção da base de dados da rede de movimentos de bovinos:</i>	37
2.4.3	<i>Rede de movimentos de bovinos e indicadores de centralidade:</i>	38
2.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	38
3	RESULTADOS	40
3.1	SPOLIGOTYPING	40
3.1.1	<i>Caracterização da amostra</i>	40
3.1.2	<i>Caracterização dos spoligotipos</i>	41
3.1.3	<i>Proximidade genética dos padrões de spoligotyping</i>	42
3.1.3.1	<i>Geolocalização dos padrões de spoligotyping com base na proximidade genética</i>	43
3.2	GEORREFERENCIAÇÃO	44
3.2.1	<i>Localização das Zonas de Caça e Explorações</i>	44
3.2.2	<i>Distância Euclidiana</i>	45
3.3	REDE DE MOVIMENTOS DE BOVINOS	47
3.3.1	<i>Caracterização da rede de movimentos de bovinos</i>	47
3.3.2	<i>Indicadores de centralidade da rede de movimentos de bovinos</i>	49
3.3.2.1	<i>Grau médio</i>	50
3.3.2.2	<i>Clustering Coeficient</i>	51
3.3.2.3	<i>Medidores de distância: Betweenness, Closeness e Eccentricity</i>	52
3.3.2.4	<i>Pagerank</i>	54
3.3.3	<i>Resumo dos indicadores de centralidade</i>	55
3.3.4	<i>Casos relevantes de ligações diretas entre explorações com focos de bTB</i>	57
3.3.4.1	<i>Estudo de caso 1 - Spoligotypings semelhantes</i>	59
3.3.4.2	<i>Estudo de caso 2 - Spoligotypings semelhantes</i>	61
3.4	MATRIZ DE PROXIMIDADE	63
3.5	ANÁLISE DOS PADRÕES DE SPOLIGOTYPING MAIS FREQUENTES EM EXPLORAÇÕES	64
3.6	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INDICADORES	65
3.6.1	<i>Zonas de caça</i>	65
3.6.2	<i>Explorações</i>	66
4	DISCUSSÃO	67
4.1	SPOLIGOTYPING	67
4.2	PROXIMIDADE GENÉTICA	68
4.3	GEORREFERENCIAÇÃO	68
4.4	REDE DE MOVIMENTOS	69
4.4.1	<i>Indicadores de Centralidade</i>	69
4.4.2	<i>Comparação dos indicadores de centralidade da rede e dos focos bTB</i>	70
4.4.3	<i>Proximidade entre explorações com focos de bTB</i>	70
4.5	ANÁLISE DOS PADRÕES DE SPOLIGOTYPING MAIS FREQUENTES EM EXPLORAÇÕES	71
4.6	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INDICADORES	72
5	CONCLUSÃO	73
	BIBLIOGRAFIA	75
	ANEXO I	87
	ANEXO II	XII

Índice de Figuras

FIGURA 1- FILOGENIA DO CMT BASEADA NAS ELIMINAÇÕES SUCESSIVAS DAS REGIÕES DE DIFERENÇA	7
FIGURA 2.1 E 2.2: FIGURA 2.1 INCIDÊNCIA ESTIMADA DE <i>M. BOVIS</i> EM HUMANOS POR REGIÃO EM 2016, FIGURA 2.2 MORTES ESTIMADAS DE HUMANOS EM 2016 POR REGIÃO	9
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DE UMA LESÃO PULMONAR GRANULOMATOSA TÍPICA NUM BOVINO	12
FIGURA 4: TÉCNICA DE SPOLIGOTYPING	18
FIGURA 5: PELÍCULA RADIOGRÁFICA DE UMA MEMBRANA DE SPOLIGOTYPING	19
FIGURA 6: PANORAMA GLOBAL DE TUBERCULOSE BOVINA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS POR PAÍS	22
FIGURA 7: ESTATUTO DA TUBERCULOSE BOVINA NOS PAÍSES MEMBROS DA UE	24
FIGURA 8: PREVALÊNCIAS DE BTB NAS EXPLORAÇÕES DE BOVINOS E BOVINOS DURANTE OS ANOS 2011-2015	27
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DE UM GRAFO FICTICIO DIRECCIONADO.....	29
FIGURA 10: FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS DO TRABALHO	39
FIGURA 11: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS EXPLORAÇÕES E ZONAS DE CAÇA EM PORTUGAL CONTINENTAL COM OS RESULTADOS DO SPOLIGOTYPING.....	43
FIGURA 12: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE FOCOS DE TUBERCULOSE EM ZONAS DE CAÇA E EXPLORAÇÕES EM PORTUGAL CONTINENTAL NOS ANOS 2013-2014.	44
FIGURA 13: REDE DE MOVIMENTOS DE BOVINOS ENTRE EXPLORAÇÕES NOS ANOS 2012 A 2014 EM PORTUGAL.	47
FIGURA 14.1,14.2, 14.3,14.4 E 14.5: REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DIRETAS ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB	58

FIGURA 15: CASO1-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LIGAÇÃO ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA	59
FIGURA 16: CASO1-CRONOGRAMA DOS MOVIMENTOS DE BOVINOS ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB	60
FIGURA 17: CASO 2-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LIGAÇÃO ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA....	61
FIGURA 18: CASO2-CRONOGRAMA DOS MOVIMENTOS DE BOVINOS ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB	62

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1: CONTAGEM DE <i>SPOLIGOTYPING</i> REALIZADOS, POR ESPÉCIE (N=206).....	40
GRÁFICO 2: PADRÕES DE <i>SPOLIGOTYPING</i> REPRESENTADOS POR ESPÉCIE.....	41
GRÁFICO 3: DENDROGRAMA DA PROXIMIDADE GENÉTICA DOS PADRÕES DE <i>SPOLIGOTYPING</i> (N=35) PELO IJ	42
GRÁFICO 4: <i>HEATMAP</i> DE DISTÂNCIA EUCLIDIANA ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB EM PORTUGAL	45
GRÁFICO 5: <i>HEATMAP</i> DE DISTÂNCIA EUCLIDIANA ENTRE ZONAS DE CAÇA COM FOCOS DE BTB EM PORTUGAL.....	46
GRÁFICO 6: MODULARIDADE DA REDE DE TROCAS COMERCIAIS ENTRE EXPLORAÇÕES DE BOVINOS	48
GRÁFICO 7.1 E 7.2: REPRESENTAÇÃO DOS GRAUS DE ENTRADA E GRAUS DE SAÍDA POR NÚMERO DE EXPLORAÇÕES.	50
GRÁFICO 8.1 E 8.2: <i>BOXPLOTS</i> : REPRESENTAÇÃO DO COEFICIENTE DE AGLOMERAÇÃO DE ENTRADA E COEFICIENTE DE AGLOMERAÇÃO DE SAÍDA	51
GRÁFICO 9: DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE <i>BETWEENNESS</i> (INTERMEDIAÇÃO)	52
GRÁFICO 10: DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE <i>CLOSENESS</i> (PROXIMIDADE).	53
GRÁFICO 11: DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE <i>ECCENTRICITY</i> (EXCENTRICIDADE)	53

GRÁFICO 12: DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE <i>PAGERANK</i>	54
GRÁFICO 13 : <i>HEATMAP</i> DA PROXIMIDADE DE LIGAÇÕES COMERCIAIS ENTRE EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA	63
GRÁFICO 14: RELAÇÃO ENTRE A DISTÂNCIA EUCLIDIANA (KM) COM O ÍNDICE DE <i>JACCARD</i> DOS <i>SPOLIGOTYPINGS</i> DAS ZONAS DE CAÇA COM FOCOS DE TUBERCULOSE (<i>N=66</i>).	65
GRÁFICO 15: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA EM MATRIZ DA CORRELAÇÃO DE <i>SPEARMAN</i> ENTRE O ÍNDICE DE <i>JACCARD</i> DOS <i>SPOLIGOTYPINGS</i> , A DISTÂNCIA EUCLIDIANA E A PROXIMIDADE DAS TROCAS COMERCIAIS ENTRE EXPLORAÇÕES (<i>N=73</i>).	66

Índice de Tabelas

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS NO HUMANO	2
TABELA 2: CONJUNTO DE ESTRATÉGIAS A IMPLEMENTAR A CURTO E MÉDIO PRAZO NO CONTROLO DA TUBERCULOSE BOVINA	21
TABELA 3: RESUMO DAS FÓRMULAS DOS INDICADORES DE CENTRALIDADE.....	32
TABELA 4: ESTATÍSTICA DESCRITIVA APLICADA AOS INDICADORES DE CENTRALIDADE	56
TABELA 5: ANÁLISE DOS PADRÕES DE SPOLIGOTYPING MAIS FREQUENTES EM EXPLORAÇÕES, E COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE PROXIMIDADE DE TROCAS COMERCIAIS E DA DISTÂNCIA EUCLIDIANA, EM EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB COM O MESMO <i>SPOLIGOTYPING</i> , E EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE BTB COM <i>SPOLIGOTYPING</i> DIFERENTE.	64

Lista de siglas e abreviaturas

BAAR: Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

BCG: Bacilo Calmette-Guérin

bTB: Tuberculose Bovina

°C: graus centígrados

CEE: Comunidade Económica Europeia

DGAV: Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DIVA: Differentiating Infected from Vaccinated Animals

ADN: ácido desoxirribonucleico

DR: sequência directa repetida (do inglês, *Direct Repeat*)

DSAVR: Direções de Serviços Veterinários Regionais

DSPA: Direção de Serviços de Proteção Animal

DVR: *Direct Variant Repeat*

ECDC: Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FNT- α : Fator de necrose tumoral alfa

ICNF: Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas

IDTC: intradermotuberculinização comparada

IFN- γ : Interferão- gama

IL-2: Interleucina 2

IS: sequência de inserção

LNIV: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

MIRU: *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*

CMT: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPPs: Organizações de Produtores Pecuários

Pb: Pares de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PETB: Programa de Erradicação de Tuberculose Bovina

PPD: *Protein Purified Derivative*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

RD: Região de Diferença

rRNA: *Ribosomal ribonucleic acid*

SNA: *Social Network Analysis*

SNIRA: Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal

TB: Tuberculose

TLR: *Tools Like Receptors*

UE: União Europeia

VNTR: *Variable Number Tandem Repeats*

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Particularidades do género *Mycobacterium*

As micobactérias estão associadas há milhares de anos, a doenças causadoras de morbilidade e mortalidade, tanto no homem como nos animais. Ainda nos dias de hoje as micobactérias são causadoras de enormes perdas económicas e humanas como é o caso da Tuberculose humana considerada como a segunda doença infecciosa com maior mortalidade no mundo. A primeira observação feita de um bacilo de tuberculose foi realizada por Robert Koch em 1882. Esta descoberta deu azo à identificação do género *Mycobacterium* (Shamputa *et al.*, 2015) sendo este, o único género da família *Mycobacteriaceae* da ordem *Actinomycetales*, (Shinnick e Good, 1994). *Mycobacterium* sp., é composto por um número crescente de novas espécies principalmente nas últimas duas décadas, atualmente conta com 170 espécies que se distribuem por diversos ambientes (Forbes, 2017). Uma das formas de classificação é a utilizada por Kazda, 2009 conforme a patogenicidade em seres humanos esta divide-se em três grupos distintos: estritamente patogénicas, potencialmente patogénicas e raramente patogénicas ou saprófitas como ilustrado na tabela 1. As espécies pertencentes ao género *Mycobacterium* possuem um conjunto de características morfológicas e fisiológicas particulares, que permite distingui-las dos demais géneros bacterianos nomeadamente: possuem uma morfologia em forma de bastonete podendo ser retilíneos ou curvos, são bactérias aeróbias estritas, Gram-positivas, imóveis e não esporuladas. No entanto a sua característica mais notável é a parede rica em lípidos, composta por ácidos micólicos com 60 a 90 carbonos, conferindo a estas bactérias características hidrofóbicas, resistência à maioria dos desinfetantes, pH extremos e dessecação (Carter e Wise, 2004). O facto de apresentarem ácidos micólicos na sua parede celular, permite reter a corante fuscina e impede a sua remoção por soluções alcoólicas ou ácidas utilizadas na coloração Ziehl-Neelsen. Desta forma, também se designam por bactérias ácido-álcool-resistentes. (P. Quinn *et al.*, 2011). Para se distinguirem as diferentes espécies de Micobactérias, podemos recorrer a diversas formas: a diferenciação morfológica das colónias (lisas ou rugosas), a velocidade de crescimento (rápido, menos de sete dias

ou lento, mais de sete dias), a temperatura ótima de crescimento, as características ecológicas e a produção de pigmentos. (Shinnick & Good, 1994).

Patogénicas				
<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. caprae</i>	<i>M. canettii</i>	<i>M. pinnipedii</i>		
Potencialmente patogénicas				
<i>M. avium avium</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. avium</i> <i>paratuberculosis</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>
Raramente patogénicas				
<i>M. agri</i>	<i>M. confluentis</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. alchiense</i>	<i>M. cooki</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. obuens</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. thermoresistible</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>	

Tabela 1: Classificação das espécies de micobactérias no Humano de acordo com a patogenicidade (adaptado de Kazda *et al.* 2009)

2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) foi denominado assim, pelo facto de um dos membros ser *M. tuberculosis*, espécie patogénica de enorme importância para os humanos, e simultaneamente também a mais escrutinada dentro deste complexo. O CMT é caracterizado por apresentar espécies de crescimento lento, causadoras de tuberculose humana e animal. Os seus membros têm a particularidade de partilharem 99,9% de homologia genética assim como sequências idênticas no gene 16S rRNA (Songer & Post, 2005). Ainda assim, estes elementos possuem diversidade fenotípica e patogénica com diferentes distribuições geográficas, estando cada espécie adaptada a hospedeiros específicos (Brosch *et al.*, 2002).

Neste complexo incluem-se as espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette–Guérin*. Mais recentemente foram incluídos *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium suricattae*, *Chimpanzee Bacillus* e *Bacilo Dassie* (Dippenaar *et al.*, 2015).

M. tuberculosis – É a principal causa de tuberculose humana. Segundo os relatórios globais de Tuberculose de 2016 da World Health Organization estima-se que entre 2 a 3 biliões da população mundial está infetada, todavia só entre 5-15% irão manifestar a doença, devido a algum tipo de imunodeficiência, sendo o VIH um dos grandes percussores do aparecimento da doença (WHO, FAO, & OIE, 2017). Também foi reportado *Mycobacterium tuberculosis* não só em espécies domésticas (bovinos, cães, gatos) como em espécies selvagens de zoológicos e parques naturais: primatas, elefantes, herpestídeos e psitacídeos. Este são casos de zoonose reversa em que os Humanos atuam como hospedeiro reservatório e transmitem o agente aos animais (Alexander *et al.*, 2002; Gordon & Behr, 2015).

M. africanum – Responsável por 1% da tuberculose em Humanos, já teve diversas classificações de momento está dividido em duas linhagens, *M. africanum West African I* com maior prevalência nas zonas do Golfo da Guiné e *M. africanum West African II* mais prevalente na costa oeste de África (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014).

Nos animais, apesar de mais raro, já foi descrito em bovinos e suínos, macacos e no damão (Kazda *et al.*, 2009; Winglee *et al.*, 2016).

M. canettii – É apontado como o membro mais próximo da espécie ancestral precursora de todo o CMT, esta espécie diverge em termos genéticos de todas as outras espécies e, tem a particularidade de originar colónias lisas e de ter um crescimento rápido.

Tem sido descrito alguns casos de tuberculose em humanos na região do Corno de África (Aboubaker Osman *et al.*, 2017).

M. bovis – é o agente etiológico da tuberculose bovina, tem como principal hospedeiro o bovino, no entanto, é altamente adaptável a uma diversidade incrível de hospedeiros incluindo o Homem. O bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é uma estirpe desta espécie, atenuada laboratorialmente e, utilizada na campanha de vacinação até hoje contra a tuberculose em Humanos (Garnier *et al.*, 2003)

M. caprae – anteriormente, dispôs várias denominações taxonómicas dentro CMT, todavia em 2003 foi designado como espécie, resultado de vários estudos encabeçados por Aranaz *et al.*, 2003. *Mycobacterium caprae*, embora mais adaptado a caprinos infecta também uma panóplia de outros hospedeiros, como bovinos, suínos e silváticos (javali e veado) (Aranaz *et al.*, 2003). Este agente, segundo a revisão de Rodriguez-Campos *et al.*, 2014, está limitado à zona geográfica do sul e centro da Europa. Também já foi comprovada a capacidade zoonótica, principalmente em humanos com contacto direto com caprinos (Aranaz *et al.*, 2003).

M. microti – Considerado a tuberculose dos roedores, foi descrito pela primeira vez em 1930, quando ocorreu uma epizootia em ratos toupeiros (*Microtus agrestis*) na Inglaterra. Este agente alcança outras espécies de pequenos roedores, ocasionalmente pode infectar animais domésticos como lamas, bovinos, suínos, cão e gato. Em humanos já foi relatado

casos, maioritariamente ligados a indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que a prevalência desta espécie e distribuição geográfica esteja subestimada, pela sua dificuldade em se obter subculturas, nomeadamente devido ao tempo de crescimento e a sua adulteração morfológica (Cavanagh *et al.*, 2002; Boniotti *et al.*, 2014).

M. pinnipedii – Ocorre principalmente em pinípedes de vida livre ou de parques zoológicos nas zonas da Europa, América do Sul e Oceânia. O risco de transmissão entre estas espécies é elevado dado a maioria destes mamíferos marinhos viverem em agregados de grande densidade. Em estudos realizados, foram reportados casos em bovinos e, também foi descrito como uma espécie com potencial zoonótico (Boardman *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2014).

M. orygis - É uma das espécies novas e ainda pouco estudadas do CMT, com uma ocorrência rara. Os casos surgem maioritariamente no sul da Ásia em animais, mas já foi reportada em pessoas que contactaram diretamente com animais infetados. Os seus hospedeiros de eleição são na maioria ruminantes da família *Bovidae* como os órix, antílopes, gazelas, veados e bovinos (Rahim *et al.*, 2017).

M. mungi - Também chamado bacilo dos mangustos, este foi primeiramente isolado, como o nome indica, em mangustos no Botswana. Este patógeno tem desde os sinais clínicos iniciais uma evolução rápida e, naturalmente, taxas de mortalidade elevada nas comunidades de mangustos, em comparação com a virulência e patogenicidade de outros integrantes do CMT. Outra particularidade deste agente é a sua principal via de transmissão não ser a via respiratória, vários estudos sugerem que poderá ser uma transmissão ambiental, o que vai de encontro ao *modus vivendi* destes hospedeiros que se alimentam de resíduos humanos (Alexander *et al.*, 2010).

M. suricattae - É uma espécie do CMT ainda em estudo. Ocorre em suricatas no deserto de Kalahari, África do Sul. Sabe-se que está intimamente ligado a outras micobactérias novas como o *Dassie Bacillus*, *Chimpanzee Bacillus* e o *M. mungi* que possivelmente provêm de um cenário evolutivo de uma linhagem de *M. africanum* (Parson *et al.*, 2013; Dippenaar *et al.*, 2015)

Bacilo Dassie - É encontrado no damão-do-cabo (*Procavia capensis*) no Sul de África. Os estudos indicam que este animais apresentam uma transmissão por via respiratória dado o a maioria das lesões se localizarem no parênquima pulmonar e pleura (Clarke *et al.*, 2016).

3 Filogenia do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

As espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, apesar de apresentarem distintas variações fenotípicas e especificidade para diferentes hospedeiros, são um dos exemplos mais extremos de homogeneidade genética, havendo uma variação de nucleótidos em torno dos 0,01%-0,03% (Gutierrez *et al.*, 2005). De facto, para se criar uma árvore filogenética é necessário recorrer a marcadores estáveis, ou seja, com baixas taxas de mutações e sem ADN repetitivo, para que a designação de espécie do complexo seja consistente. São considerados marcadores estáveis no CMT as regiões de diferença –RD (*Regions of difference*), regiões essas menos propensas a fenómenos de homoplasia. Outro tipo de marcador também utilizado são os nucleótidos de polimorfismo único (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*), que estão presentes em diversos genes, como por exemplo: *oxyR*, *pncA*, *katG*, *gyrA*, *gyrB*. Alguns SNPs têm a capacidade de diferenciar determinadas características fenotípicas nas estirpes de micobactérias, como é o caso da resistência a medicamentos e/ou a virulência do agente (Stucki & Gagneux, 2013; Rodriguez-Campos *et al.*, 2014).

À exceção de *M. canetti* e de algumas estirpes com colónias lisas, em que há evidência de transferência horizontal de genes, os marcadores RD são representantes de fenómenos evolutivos unidireccionais. Uma vez que, as deleções desses marcadores são irreversíveis, é de esperar que quanto maior o número de deleções mais recente é a espécie do complexo. Estas afirmações são corroboradas com os estudos de Brosch e colaboradores, que desenharam o quadro evolutivo do CMT, por outras palavras, sugere que a evolução da espécie ancestral do CMT terá perdido inicialmente a região RD9, posteriormente a RD7, RD8 e RD10 e atualmente a RD12, RD13 e RD4 (figura 1). A eliminação destes últimos marcadores deu origem à espécie *Mycobacterium bovis* que por consequência tem um genoma de menores dimensões, assim como não apresenta nenhum gene que lhe seja exclusivo (Garnier *et al.*, 2003)

É de notar que as estirpes vacinais de *M. bovis*, os bacilos de Calmette-Guérin (BCG), apresentam uma deleção na RD1 o que sugere um papel importante desta região na virulência das espécies patogénicas do complexo (Brosch *et al.*, 2002).

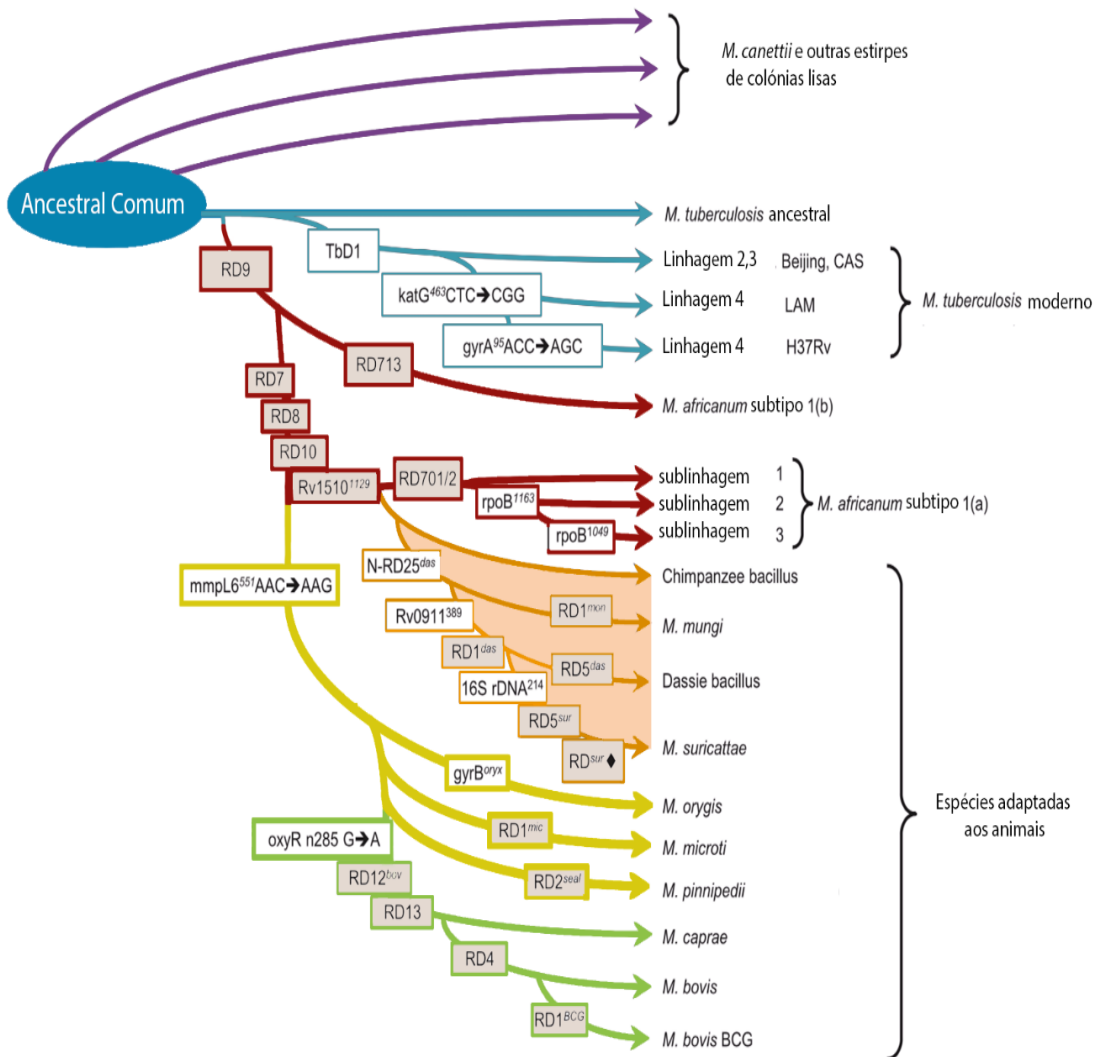


Figura 1: Filogenia do CMT baseada nas eliminações sucessivas das regiões de diferença (RD). As caixas cinzentas representam as deleções das RD, as caixas brancas os SNPs. (Adaptado de Dippenaar *et al.*, 2015)

4 Tuberculose Bovina

4.1 Introdução

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa com caráter zoonótico, que apresenta uma evolução habitualmente crónica, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas que lhe são características.

Mycobacterium bovis agente etiológico da tuberculose bovina, tem uma distribuição cosmopolita e capacidade de infetar um enorme leque de hospedeiros, incluindo o Homem. Nas espécies domésticas, os hospedeiros de eleição são os bovinos, onde são relatados um maior número de casos (Fitzgerald & Kaneene, 2013).

Em 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou 147 mil novos casos de tuberculose bovina (bTB) em humanos com mortalidade na ordem das 12 mil, como apresentado nas figuras 2.1 e 2.2. As implicações desta doença extravasam facilmente a esfera da saúde pública. Tendo em conta que existem zonas de grande prevalência de bTB em bovinos e animais silváticos, que promovem a manutenção e transmissão do agente, traduzindo-se em cerca de 50 milhões de bovinos infetados em todo o mundo, com um impacto a nível económico na ordem dos 2,5 biliões de euros, devido fundamentalmente a reduções da produção de leite e carne, embargos comerciais e planos de contingência. (WHO, 2017)

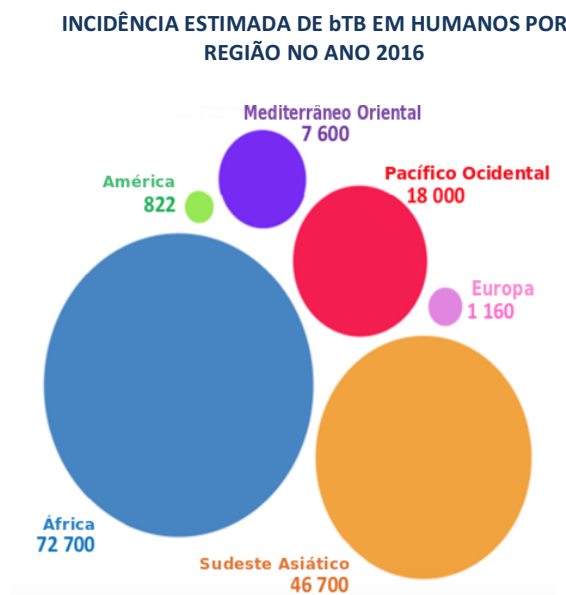


Figura 2.1

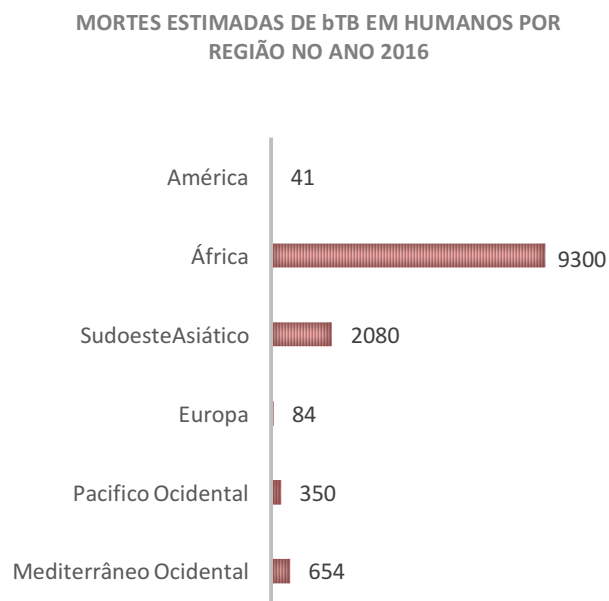


Figura 2.2

Figura 2.1 e 2.2: Figura 2.1: Incidência estimada de *M. bovis* em humanos por região no ano 2016. Figura 2.2: Mortes estimadas de humanos por região no ano 2016, para um IC de 95%. Adaptado: de Global Tuberculosis Report 2017 - WHO.

4.2 Meios de Infecção e Transmissão

O agente da bTB adquiriu, ao longo da sua evolução, uma dinâmica bastante flexível para se perpetuar, tanto que, dependendo do meio e dos hospedeiros com que interage, este comporta-se de diferentes formas.

O *M. bovis* apresenta diversas vias de infecção, nos bovinos a mais frequente é a via aerógena por exposição a aerossóis contaminados, destaca-se das demais por ser necessário uma menor dose infectante para que ocorra infecção. Contudo, outras vias são plausíveis, nomeadamente a digestiva, a congénita e, mais raramente, a via sexual.

A transmissão ocorre por duas formas, a direta e indireta. Na transmissão direta, ocorre contacto direto entre um animal infetado e um suscetível, geralmente entre animais da mesma espécie e com hábitos comunitários (Phillips *et al.*, 2003). Num contexto nacional, exemplos de transmissão direta são: o caso das fêmeas de javali que coabitam em grupos sociais, os hábitos gregários dos veados, ou os bovinos em regime intensivo.

Na transmissão indireta, ocorre por contaminação ambiental, com condições favoráveis por período suficiente para infectar outros hospedeiros. Usualmente este tipo de transmissão está mais associada a hospedeiros de espécies distintas, seja por os animais ficarem expostos a carcaças de animais doentes, ou por partilharem pastagens e água contaminadas (Phillips *et al.*, 2003; Santos, 2016). O modo como os animais se contagiam é através do contacto com material contaminado proveniente de descargas nasais, fezes, urina, mucosas, leite e sêmen (Carter & Wise, 2004).

4.3 Patogenia

As lesões primárias da tuberculose bovina estão intimamente ligadas à via de infecção do animal. Nos bovinos, a via mais comum é a via aerógena, por outras palavras, se o animal inalar material contaminado, é presumível que as lesões iniciais ou também chamado “complexo primário”, que abarca a lesão inicial e o linfonodo regional, surjam no aparelho respiratório, nomeadamente no trato respiratório superior que comporta os linfonodos retrofaríngeos e tonsilas e, no trato respiratório inferior, onde lesões mais comuns são nos pulmões, linfonodos mediastínico e traqueobrônquicos (Menzies & Neill, 2000).

No sistema digestivo, especialmente nos linfonodos mesentéricos e trato intestinal ocorre quando o animal se infeta por ingestão de alimento contaminado. As lesões hepáticas ou no sistema porta estão associadas a transmissão vertical. Apesar de incomum, também estão descritas lesões primárias de tuberculose nos órgãos genitais com provável transmissão sexual. Foram descritas recentemente lesões de tuberculose mamária, como presumível consequência de transmissão iatrogénica por tratamentos intramamários em vacas. No entanto estes últimos são cada vez mais raros, sobretudo com a implementação de programas de erradicação de tuberculose bovina (Domingo *et al.*, 2014)

4.4 Resposta imune e lesões anatomopatológicas

A entrada do agente no organismo do hospedeiro, despoleta uma resposta imune derivada da imunidade inata do animal. Nesta primeira barreira, estão implicados vários mecanismos de defesa inespecíficos contra organismo invasores.

Pressupondo que a via de infecção por inalação é a forma mais usual de infecção de um bovino, o agente é detetado pelo sistema imune fagocitário sendo, os neutrófilos e posteriormente os macrófagos alveolares, as primeiras células envolvidas na resposta imunitária contra o agente. As micobactérias são eficientemente fagocitadas pelos macrófagos através de recetores ao nível da membrana plasmática que se ligam aos bacilos (Pollock & Neill, 2002).

Num processo normal de fagocitose ocorre fusão do fagossoma com o lisossoma, originando um fagolisossoma nas quais as bactérias são eliminadas. No entanto, as micobactérias têm um conjunto de mecanismos que por vezes impedem a sua fusão, através do bloqueio da maturação do fagossoma prevenindo assim, a sua degradação e apresentação antigénica, conseguindo estabelecer-se num ambiente no qual são capazes de sobreviver e multiplicar-se intracelularmente (Teixeira *et al.*, 2007)

Duas a três semanas após a infecção (Crevel *et al.*, 2002), desenvolve-se a imunidade específica, sendo predominantemente do tipo celular. Nesta fase de reconhecimento dos bacilos *M. bovis* destacam-se os TLR (*Tool Like Receptors*) que são recetores transmembranários expressos nas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas e que, por sua vez, desempenham um papel essencial entre a ligação da resposta inata e específica. Estes medeiam uma resposta inflamatória através da produção de citocinas anti-inflamatórias e pró inflamatórias que permitem ativar a resposta imune dos linfócitos T, T CD4⁺ (T helper) e T CD8⁺ (T citotóxico). De entre estes, destacam-se Linfócitos Th1 pela particularidade de produzirem várias citocinas relevantes, como a IL-2, o TNF- α e o IFN- γ que medeiam o processo de ativação e regulação da atividade bactericida dos macrófagos (R. van Crevel *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2007; Umemura *et al.*, 2007).

A acumulação de células inflamatórias em redor das micobactérias, promove o aparecimento de uma lesão granulomatosa, constituída por uma lesão central caseosa, composta

por neutrófilos, células epitelioides e células gigantes de Langerhans, estas últimas características nas lesões de tuberculose. A periferia da lesão, é formada por linfócitos e macrófagos (figura 3), podendo ainda contemplar tecido conjuntivo fibroso a encapsular a lesão (Domingo *et al.*, 2014). Em fases avançadas, a lesão tuberculosa evoluirá para uma necrose de caseificação no centro com possível calcificação distrófica, comum nos linfonodos dos bovinos. Os fatores como a imunidade do hospedeiro e virulência do agente vão contribuir para o desfecho da infecção, podendo ela regredir pela eliminação do agente e ocorrer cura espontânea, ou haver sequestro permanente do agente num granuloma, configurando este processo como um período estacionário. Outros quadros da doença podem ser a progressão da infecção através da disseminação de bacilos por via linfo hemática ou por contiguidade. A reinfeção endógena ou exógena, constitui os casos de tuberculose crônica evolutiva. Por último pode dar-se a reativação de lesões antigas por colapso da resistência geral (Plana & Quezada, 2004).

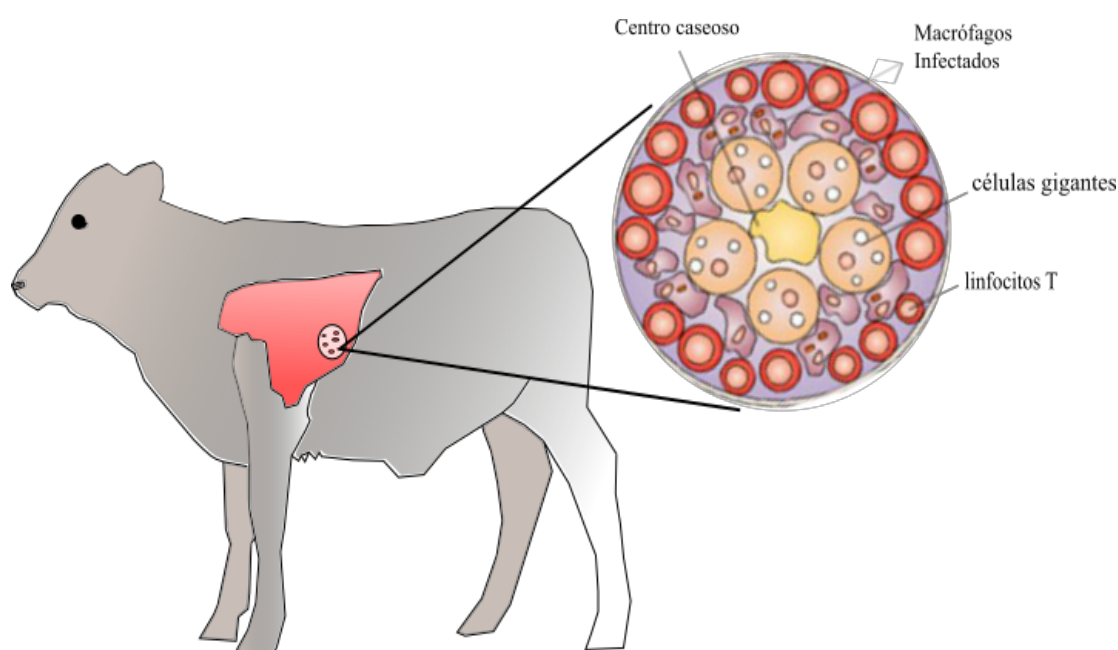


Figura 3: Representação de uma lesão pulmonar granulomatosa típica num bovino adaptado de Quinn *et al* 2011.

4.5 Diagnóstico de Tuberculose Bovina

Com a evolução da ciência e, por consequência das técnicas de diagnóstico, torna-se imperativo aliá-las ao controlo e erradicação de doenças que ainda têm um impacto significativo sobre a saúde pública. Na tuberculose bovina, com exceção da vacinação oral de BCG vivo atenuado em texugos no Reino Unido (Perrett *et al.*, 2018), a vacinação de animais está interdita na Europa, por não ser possível distinguir, se o animal está vacinado ou infetado por *Mycobacterium bovis* (Vordermeier *et al.*, 2016) enquanto não se implementar uma vacina DIVA (*Differentiate Infected from Vaccinated Animals*), têm-se desenvolvido e aperfeiçoado técnicas para um diagnóstico mais célere e eficiente do agente, seja por técnicas convencionais, tais como o diagnóstico pela prova da intradermotuberculinização comparada (IDTC), interferão-gama e técnicas bacteriológicas, ou por técnicas moleculares, sendo atualmente consideradas ferramentas essenciais para um conhecimento mais profundo de *Mycobacterium bovis*, servindo de base, na investigação epidemiológica e consequentemente, a um controlo mais capaz da doença.

4.5.1 Métodos de diagnóstico *in vivo*

4.5.1.1 Prova da Intradermotuberculinização comparada (IDTC)

A IDTC é um teste oficial e obrigatório (Anexo B do Decreto-Lei nº 157/98, de 9 de Junho) de despiste de tuberculose bovina em Portugal. O objetivo do teste é verificar se ocorre nos bovinos uma reação de hipersensibilidade do tipo IV, isto é, após a administração da PPD bovina e de PPD aviária (proteína purificada derivada de estirpes de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium avium* respetivamente), no caso de positividade do animal, verifica-se a mobilização de linfócitos T e monócitos sensibilizados, para o local da inoculação intradérmica (Sakamuri *et al.*, 2015).

No procedimento, recorre-se a duas inoculações intradérmicas de tuberculina bovina e tuberculina aviária entre o terço anterior e médio do pescoço, distando verticalmente um palmo entre elas (DGAV, 2005).

A reação deve ser verificada através da medição da prega de pele por um cutímetro, antes da inoculação das tuberculinas e 72h após inoculação e, posteriormente, comparadas as reações da tuberculina aviária e tuberculina bovina. O animal é considerado positivo caso

a reação local da tuberculina bovina, for superior em 4mm em relação à tuberculina aviária (DGAV, 2005; P. J. Quinn, 2011; Vordermeier *et al.*, 2016).

Os falsos-negativos podem ocorrer devido a um amplo espectro de situações nomeadamente: animais infetados há menos de 30 dias, casos de imunossupressão derivado a *stress*, pós-parto, doenças autoimunes, doenças infecciosas ou administração de corticosteroides, casos de anergia em animais com fases avançadas de tuberculose e problemas relacionados com execução da técnica ou leitura do resultado. Os falsos-positivos surgem por situações de reação cruzada a outras micobactérias, daí ser importante a utilização da tuberculina aviária de modo aumentar a especificidade e a diminuir o número de falsos-positivos (Sakamuri *et al.*, 2015; P. J. Quinn, 2011)

Recorre-se ao teste para efeito de classificação sanitária da exploração quanto à bTB, para os testes de pré-movimentação de bovinos, ou sempre que se justifique a testagem do efetivo. As normas da aplicação da IDTC, bem como as regras da sua implementação, apresentam-se de forma mais exaustiva no “Manual de apoio a erradicação de tuberculose bovina” (2005) e no “Manual de procedimentos à implementação dos testes de pré-movimentação em território nacional” (2012).

Embora hajam vários fatores envolvidos na diminuição da sensibilidade e especificidade da IDTC, esta continua a ser empregue até ao momento, por apresentar uma boa relação custo/benefício para o rastreio de efetivos.

4.5.1.2 Teste Interferão- γ

O teste de IFN- γ (interferão-gama) é um teste oficial de diagnóstico complementar, que tem como pressuposto aumentar a sensibilidade do teste de IDTC.

No âmbito do plano de erradicação, utiliza-se em situações de animais duvidosos à tuberculina em explorações não oficialmente indemnes ou, em explorações com positividade crónica à bTB, no sentido de evitar o abate total do efetivo

Com o teste pretende-se comparar e quantificar a libertação da citocina de IFN- γ por linfócitos T previamente sensibilizados pela PPD mamífera e PPD aviária. No caso do animal estar infetado com *M. bovis* ocorre maior produção IFN- γ (Pollock *et al.*, 2005). As vantagens do teste IFN- γ é a sua alta sensibilidade, a deteção de bovinos infetados mais precocemente em comparação com a IDTC e a simplificação do manejo dos animais,

por apenas ser necessária uma colheita de sangue. As desvantagens centram-se primeiramente na logística, pois a amostra deve ser enviada para o laboratório 8h após a colheita com temperaturas entre os 10°C-26°C. Outros fatores são, o custo elevado, a possibilidade de ocorrer uma resposta não inespecífica na estimulação de IFN- γ em animais com menos de 6 meses e, sobretudo, o facto da especificidade do teste do IFN- γ ser considerada inferior à da IDTC, não o tornando apropriado como teste único no rastreio de efetivos (Sakamuri *et al.*, 2015).

4.5.2 Métodos de diagnóstico bacteriológicos

Os métodos bacteriológicos utilizados para identificação do agente da tuberculose bovina são levados a cabo pelo laboratório de referência, LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária) através de amostras de tecidos colhidos de carcaças com lesões suspeitas provenientes de montarias, achados de matadouro, ou abate sanitário de animais positivos ao teste da tuberculina. Nestes últimos casos, é feita uma inspeção minuciosa das carcaças e são retiradas amostras das lesões macroscópicas e linfonodos satélite. Em caso de ausência de lesões visíveis é recomendado, todavia, retirar amostras dos linfonodos retrofaringeos, mediastínicos, traqueobrônquicos, mesentéricos e cervicais superficiais para análise (Plana & Quezada, 2004)

No LNIV procede-se à observação das amostras no microscópio, a partir de um esfregaço com coloração Ziehl-Neelsen específico para BAAR. Este diagnóstico é apenas presumitivo, uma vez que somente indica que estamos perante micobactérias, no entanto, numa primeira abordagem, é considerado um método rápido e económico.

Nos bovinos, há a particularidade das lesões nestes animais apresentarem baixo número de micobactérias, tornando o método bastante menos sensível, ao contrário de, por exemplo, nos veados.

O isolamento do *M. bovis* necessita de uma serie de procedimentos laboratoriais. Em primeiro lugar, a descontaminação com hidróxido de sódio de 2-4% durante 30 minutos, posteriormente realiza-se a centrifugação, de modo a concentrar as micobactérias (Quinn, 2011). Seguidamente procede-se à inoculação do agente em meios de cultura específicos. No LNIV, utilizam-se frequentemente o meio líquido Bactec 460 (método radiométrico) e os meios sólidos Lowenstein-Jensen e Stonebrink incubados a 37°C, podendo ocorrer

o aparecimento de colónias de *Mycobacterium bovis* até após oito semanas. É então efectuada a identificação fenotípica das colónias e podem também ser realizados testes bioquímicos (Duarte, 2008).

4.5.3 Métodos moleculares de genotipagem

As análises moleculares para identificação e distinção de microrganismos estão cada vez mais em voga, podem ser usadas em diferentes finalidades, como por exemplo no diagnóstico clínico ou na investigação, ao ponto de permitir, traçar um perfil epidemiológico dos agentes infecciosos.

Como é sabido, as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* partilham quase a totalidade de seu ADN, porém existem uma panóplia de análises moleculares desde kits comerciais a vários métodos *in house* disponíveis que, consoante o seu poder discriminatório, permitem distinguir géneros, espécies ou estirpes (OIE, 2009).

Desde 1990 (Tortoli *et al.*, 2012) que tem havido progressos no sentido da uniformização dos testes, devendo estes obedecer a alguns padrões, nomeadamente: uma reprodutibilidade consistente, uma menor complexidade e menor custo económico (El-Sayed *et al.*, 2016).

No caso da epidemiologia molecular, nas espécies do CMT e em particular de *M. bovis*, vários elementos genéticos contribuem para o polimorfismo do ADN, nomeadamente as zonas de IS (Insertion Sequence), as zonas DR (Direct Repeats) e os MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). Contemplando estas zonas de polimorfismo genético, foram desenvolvidas algumas técnicas de genotipagem: as que analisam o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição na sequência IS6110 (RFLP-IS6110) e, mais recentemente, com recurso à amplificação de regiões polimórficas baseado em PCR onde se destacam o Spoligotyping e o MIRU-VNTR (Brosch *et al.*, 2002).

O RFLP-IS6110 é uma técnica de genotipagem onde ocorre digestão do ADN pela enzima de restrição PvuII (Radhakrishnan *et al.*, 2001) com o objectivo de detetar variações geradas pela posição das diferentes sequências de inserção IS6110 no genoma. A IS6110 tem 1335 pb e é exclusiva do CMT, podendo existir múltiplas cópias inseridas de forma aleatória no genoma das espécies (Thierry *et al.*, 1990; Cowan *et al.*, 2002). É considerado

o gold-standard para a genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* por ser bastante discriminatório e a variação do seu relógio molecular ser lenta (Cowan *et al.*, 2002). No entanto, apresenta escassa discriminação em espécies com número de cópias da IS6110 inferiores a seis, o que acontece para *M. bovis*, tendo menor utilidade para os estudos onde se inclua o agente da bTB (Thierry *et al.*, 1990; Roychowdhury *et al.*, 2015).

Na genotipagem por amplificação de regiões polimórficas baseado em PCR, são usualmente utilizados: o *spoligotyping*, que estuda o polimorfismo da região DR e que será abordado com mais detalhe no próximo tópico, e o polimorfismo das regiões MIRU-VNTR (número de repetições em tandem destas regiões).

O VNTR- *typing* é uma técnica molecular que se baseia na análise de *loci* dispersos pelo genoma de microrganismos, no caso das micobactérias essas sequências minissatélites de 40 a 100 pb são designadas por MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) (Skuce *et al.*, 2002). Na análise dos MIRU-VNTR através da amplificação por PCR, é possível o cálculo do número de repetições em tandem para cada *locus*, com base no tamanho do produto amplificado (Skuce *et al.*, 2002; Sola *et al.*, 2003). Atualmente ainda não existe uma uniformização dos VNTR a aplicar nos estudos mas, segundo Roring *et al.*, 2004, dado a diversidade dos *loci* suscetíveis de caracterizar, estes podem ser ajustados consoante o tipo de estudo em causa e o cenário epidemiológico, de modo a escolher um painel de *loci* com maior índice de discriminação.

4.5.3.1 Spoligotyping

Foi no início da década de 90 que se descobriu a natureza polimórfica do *locus* DR, que abrange um número variável de cópias de repetição direta (DVR – *Direct Variant Repeat*) (Groenen *et al.*, 1993).

Os DVRs contêm sequências estáveis de DR de 36 pb intercaladas por 43 sequências espaçadoras específicas e não repetitivas de 35 - 41 pb (figura 4). Este achado permitiu desenvolver no ano 1997 por Kamerbeek e colaboradores o método *spoligotyping* cujo nome deriva de *Spacer Oligonucleotide Typing* (Kamerbeek *et al.*, 1997).

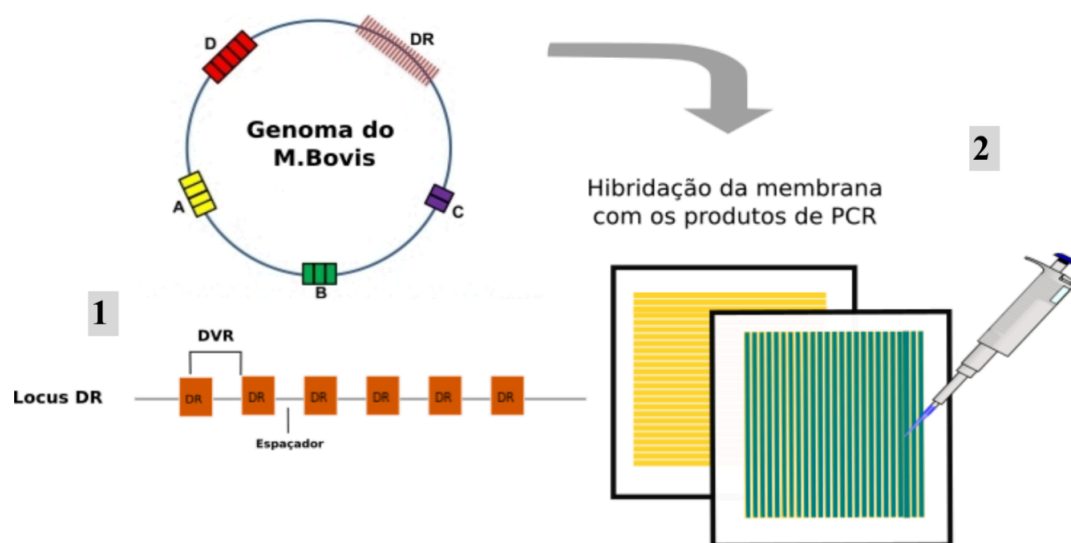


Figura 4: Técnica de *spoligotyping*. 1- Locus DR com cópias de DVR – *Direct Variant Repeat* contendo sequências estáveis de DR e sequências espaçadoras específicas e não repetitivas de 35 - 41 pb. 2- Hibridação dos produtos de PCR com a membrana de *spoligotyping* Adaptado de Comas *et al.*, 2009.

O *spoligotyping* é uma técnica de genotipagem baseada na amplificação por PCR da região polimórfica DR que gera padrões binários consoante a presença ou ausência dos espaçadores (Warren *et al.*, 2002). Esta técnica inicia-se a partir da extração de ADN das micobactérias por ruptura mecânica e posteriormente amplificada por PCR a região DR através de um par de sequências iniciadoras marcadas com a biotina. Após este passo é necessário diluir e desnaturar os produtos da amplificação obtidos, de modo a se obter cadeias simples de ADN. São então colocados numa membrana através de um *minibotter*, para que haja hibridação dos produtos de PCR com os oligoelementos (correspondentes às sequências espaçadoras) da membrana.

A membrana é um película quadrangular de nylon que possui 43 oligoelementos correspondentes aos espaçadores, e que tem capacidade para abarcar 43 isolados onde se inclui dois controlos positivos representados pelas estirpes *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG e um controlo negativo de água bidestilada.

Segue-se uma nova etapa onde é utilizado um conjugado de estreptavidina-peroxidase que se liga aos produtos de PCR hibridados marcados com biotina. É posteriormente adicionado um substrato de quimioluminescência que reage com a peroxidase, ocorrendo a emissão de fotões que são impressionados numa película autorradiográfica, o resultado

final está representado na figura 5.

Na película autorradiográfica, por cada espaçador presente é produzido um retângulo escuro, enquanto a inexistência de determinado espaçador é indicada pela ausência na respectiva posição. O perfil de spoligotyping obtido pode ser convertido em código binário com 43 caracteres (0 representa a ausência da sequência espaçadora e 1 a presença da mesma). É comum mencionar as estirpes por um código de seis caracteres representado por duas letras SB que denomina “*Spoligotype Bovis*” e quatro números. No site MBovis.org os perfis obtidos podem ser convertidos automaticamente e adicionados às bases de dados do site.

Apesar do spoligotyping ter um poder discriminatório inferior à genotipagem MIRU-VNTR- é uma mais valia no sentido de ser uma metodologia rápida, apresentar uma boa reprodutibilidade inter-laboratorial e com custos bastantes acessíveis (Sola *et al.*, 2003).

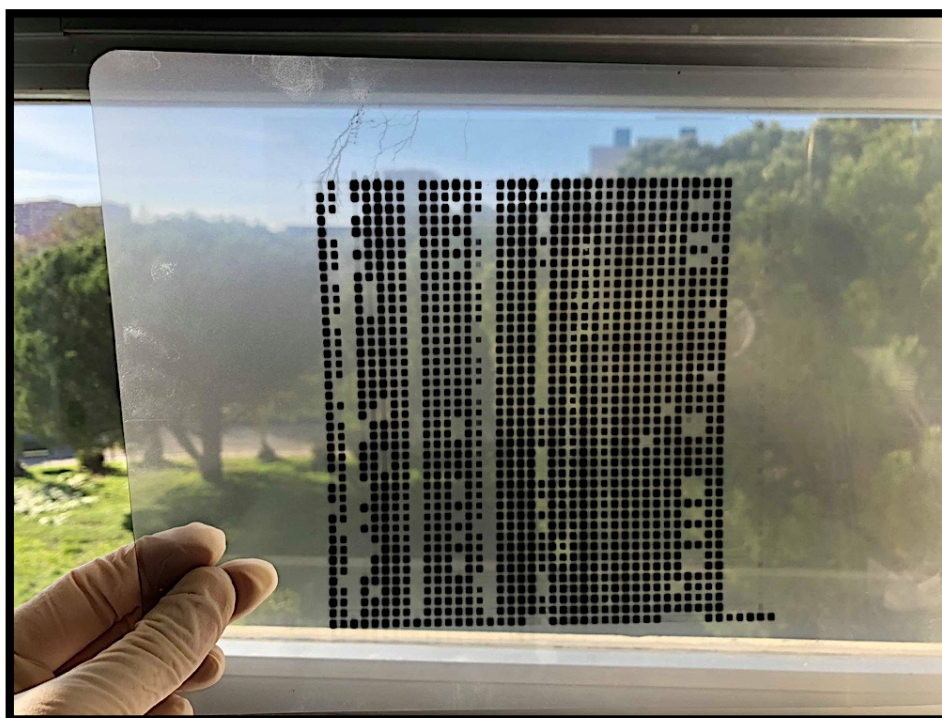


Figura 5: Película radiográfica de uma membrana de Spoligotyping, foto tirada no LNIV.

5 Epidemiologia

5.1 Panorama Global da bTB

A Tuberculose Bovina é endêmica em muitas populações animais do mundo, como apresentado na figura 6, o que acarreta enormes perdas económicas e humanas.

A sua vigilância é desafiadora, devido à sua epidemiologia complexa subjacente, que envolve múltiplos hospedeiros em populações domésticas e selvagens díspares pelo mundo. Exemplo disso, é a disposição dos hospedeiros reservatórios consoante a área geográfica como é o caso na Nova Zelândia do cusu ou possum (*Trichosurus vulpecula*), na África do Sul o búfalo africano (*Syncerus caffer*), no Michigan-Estados Unidos é relatado no veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), já na Europa, no Reino Unido está identificado o texugo (*Meles meles*), enquanto na Península Ibérica ocorre em javalis (*Sus scrofa*) (Palmer, 2013) e veados (*Cervus elaphus*). Outros animais silváticos podem ser considerados *Spillovers-hosts* (hospedeiros acidentais) o que significa que eles podem infectar bovinos, mas não desempenham um papel fulcral na manutenção e transmissão (WHO, 2017).

Atualmente decorrem no mundo alguns planos de controlo e erradicação, nomeadamente na Europa, Japão, Nova Zelândia, Estados Unidos e alguns países da América Central e do Sul (Amato *et al.*, 2018), todavia, a implementação dos planos de controlo e erradicação de bTB, ainda está restrito a países com capacidade económica, dado o alto custo de implementação do mesmo. Países como a Austrália, Canadá, França, Alemanha e países nórdicos já alcançaram a erradicação da doença com sucesso, o que vem reforçar a importância destes programas (Santos, 2016).

Em Outubro de 2017 a OMS (Organização Mundial de Saúde), a OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) e a União internacional contra a tuberculose e doenças respiratórias (*The Union*) lançaram um roteiro com um conjunto de estratégias a ser implementadas a curto e médio prazo para o controlo da tuberculose bovina, que vai de encontro aos objetivos que a OMS se propôs a concretizar, através do projeto “WHO’s End TB Strategy” que visa acabar com a epidemia mundial de tuberculose até 2030.

O roteiro está focado numa abordagem de Uma Só Saúde -*One Health*-, reconhecendo a interdependência dos setores da saúde humana e animal, de modo a enfrentar os principais

impactos económicos e na saúde que a tuberculose bovina provoca.

São definidas dez prioridades de ação centradas em torno de três pilares (tabela 2), são eles:

Melhoramento da base de evidência científica	Reduzir a transmissão da interface Homem-animal	Fortalecer ligações intersectoriais e colaborativas
1. Recolher, analisar e divulgar sistematicamente dados da incidência de Tb zoonótica em humanos e melhorar a vigilância e notificação de Tb bovina em animais domésticos e selvagens;	4.Desenvolver estratégias para melhorar a segurança alimentar;	7.Aumentar a consciencialização da TB zoonótica, envolver entidades públicas e privadas e estabelecer uma colaboração intersectorial efetiva.
2. Expandir e melhorar as ferramentas de diagnóstico de tuberculose zoonótica em humanos;	5.Desenvolver a capacidade do setor da saúde animal de modo a reduzir prevalência de TB nos animais de pecuária.	8. Desenvolver e implementar políticas e diretrizes para a prevenção, vigilância, diagnóstico e tratamento da TB zoonótica, de acordo com as normas intergovernamentais quando relevante;
3. Identificar e abordar as lacunas de investigação na TB zoonótica e bovina, incluindo epidemiologia, ferramentas de diagnóstico, vacinas, regimes de tratamento eficazes para pacientes, sistemas de saúde e intervenções coordenadas com serviços veterinários.	6. Identificar populações-chave e fatores de risco para transmissão de TB zoonótica.	9. Identificar oportunidades para intervenções adaptadas à comunidade que abordem conjuntamente a saúde humana e animal; 10. Desenvolver compromissos políticos e de financeiros para lidar com a tuberculose zoonótica em todos os setores a nível global, regional e nacional.

Tabela 2: Conjunto de estratégias a implementar a curto e médio prazo para o controlo da tuberculose bovina adaptado de (WHO *et al.*, 2017)

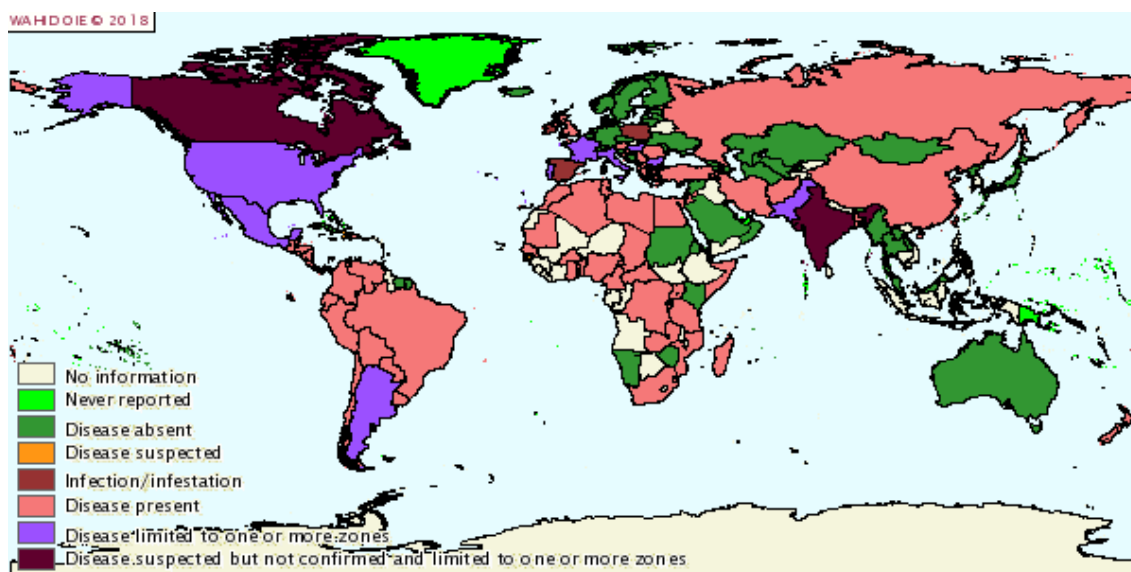


Figura 6: Panorama global de tuberculose bovina em animais domésticos e selvagens por país de Janeiro-Julho 2016. Adaptado de: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap.

5.1.1 Tuberculose Bovina na União Europeia

Desde 1970 que a tuberculose bovina representa um tema de relevo para a União Europeia com aprovação das primeiras medidas de financiamento a programas nacionais de erradicação e medidas regulamentares nos estados membros. Segundo o tribunal de contas europeu, no relatório especial “Programas de erradicação, controlo e vigilância destinados a limitar as doenças animais” nos anos 2009-2014 foi a doença com mais financiamento despendido na ordem de 346,4 milhões de euros (European Court of Auditors, 2016).

A Diretiva do Conselho 64/432 da CEE, tem como fim regulamentar o controlo e erradicação de bTB nos estados membros, através da implementação de regras do comércio intracomunitário e extracomunitário de animais, critérios de classificação sanitária dos efetivos, testes de diagnóstico de apoio à erradicação, e regras de obtenção de um estatuto oficialmente indemne (Duarte, 2008).

De acordo com a legislação em vigor, um Estado Membro ou região é considerado oficialmente indemne de tuberculose bovina quando satisfeitas as seguintes condições: Cada bovino deve estar identificado e registado de acordo com o Regulamento (CE) nº 820/97; O rastreio de bovinos através do regime de identificação e registo de bovinos, relativos à

rotulagem de carne e de produtos derivados de carne de bovinos; Todos os bovinos abatidos são sujeitos a uma inspeção sanitária oficial; A percentagem anual de efetivos confirmados como infetados não exceda 0,1% durante seis anos consecutivos e pelo menos 99,9% dos efetivos têm o estatuto de oficialmente indomnes de tuberculose no final de cada ano, também durante um período de seis anos.

No relatório científico da EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos) e do ECDC (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças) intitulado "O relatório de síntese da União Europeia sobre tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de alimentos em 2016" produziu uma lista de países oficialmente indomnes e não oficialmente indomnes. Bulgária, Croácia, Chipre, Grécia, Irlanda, algumas regiões de Itália, Portugal (exceto Algarve), Roménia, Espanha e Reino Unido são considerados não oficialmente indomnes de acordo com a legislação da UE (Decisão 2014/91/ UE35) como representado na figura 7.

Atualmente, na União Europeia a prevalência de tuberculose bovina é bastante baixa, na ordem dos 0,7 %, no entanto a sua distribuição não é uniforme. A prevalência pode variar desde a ausência de animais positivos, até uma prevalência regional em países não oficialmente indomnes como a região de Andaluzia, Espanha com uma prevalência em explorações de 15,8% (European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

Muitos fatores podem ser atribuídos à dificuldade de alguns estados membros em erradicarem a tuberculose bovina, desde os sistemas de criação de bovinos, a diferenças ambientais, à própria ecologia dos silváticos, em particular aqueles que atuam como hospedeiro reservatório. Segundo um estudo de Rivière *et al.* 2014, apenas 8 em 21 países membros entrevistados declararam ter implementado vigilância passiva e/ou ativa em espécies silváticas. No entanto, a identificação e a prevenção efetiva são uma determinante chave da eficácia das medidas de controlo, apesar da falta de exigência de obrigatoriedade da vigilância de tuberculose em animais selvagens na legislação da UE (Rivière *et al.*, 2014).



Figura 7: Estatuto da tuberculose bovina nos países membros da UE – adaptado de EFSA e OCDC 2017.

5.1.2 Tuberculose Bovina em Portugal

Em Portugal a tuberculose bovina é uma realidade presente em todo o território exceto na região do Algarve. A implementação do programa nacional de erradicação de tuberculose bovina, cofinanciado por fundos Europeus desde 1991, é reavaliado anualmente e visa a vigilância da população bovina e a redução na prevalência e incidência da doença apoiada pela legislação da Diretiva 64/432 CEE de 26 de Junho e o Decreto-Lei no 272/2000 de 8 de Novembro de 2000 que define os estatutos sanitários das explorações, as regras de testagens dos efetivos e o controlo de movimentações de animais (DGAV, 2017).

O plano de erradicação apresenta uma organização hierárquica, é elaborado pela DGAV, autoridade nacional responsável pelo controlo e erradicação da tuberculose bovina e o seu serviço central DSPA (Direção de Serviços de Proteção Animal) responsável pela coordenação e acompanhamento do programa. No continente, estão distribuídas cinco direções regionais (DSAVR) constituídas pelo Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo

e Algarve. São responsáveis pela atribuição do estatuto das explorações, controlos oficiais, investigações epidemiológicas, inspeção de carcaças em matadouro e, supervisão do cumprimento da identificação de animais e testagens de efetivos pelas Organizações de Produtores Pecuários (OPPs), que devem registar os resultados no site Pisa.net. Esta plataforma informática é um sistema de informação e gestão de saúde animal oficial, que permite a centralização de toda a informação sobre identificação, atividade sanitária, classificação e testes de diagnóstico dos animais e explorações.

Em caso de bovinos com lesões suspeitas em matadouro, animais com positividade a bTB direcionados para abate sanitário ou IDTC duvidoso que requeira teste diagnóstico complementar, as amostras são remetidas para o LNIV, entidade responsável para o diagnóstico laboratorial. Face aos resultados da IDTC e resultados laboratoriais, os estatutos das explorações são mantidos ou alterados pela DSAVR que se definem por: T3 - oficialmente indemne, T2 - não oficialmente indemne, T2.1- efetivos não oficialmente indemne com doença e T3S- efetivo oficialmente indemne com classificação sanitária suspensa. Os procedimentos para obtenção do estatuto oficialmente indemne estão resumidos no esquema do anexo 1.

Em caso de explorações T3, têm-se em conta a tipologia da exploração e a região onde a mesma se insere (segundo a prevalência de bTB), de forma estabelecer-se a idade de testagem por IDTC dos efetivos, como demonstrado no mapa no anexo 2. As estratégias para 2017, incluiu no PETB a testagem de todos os bovinos destinados a engorda independente da zona onde se inserem (exceto DRAVR Algarve) com idades superiores a 6 semanas (DGAV, 2017).

Outras ferramentas fundamentais incluídas no programa de erradicação, é Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal (SNIRA) que permite a rastreabilidade dos bovinos através de uma base de dados informatizada que se encontra regulamentado pelo Decreto-Lei nº 142/2006 de 27 de Julho, e os testes de pré-movimentação que são executados em todos os animais com mais de 12 meses nos 30 dias antecedentes à introdução dos animais numa nova exploração.

Nos últimos anos, os esforços conjuntos no desenvolvimento do PETB têm permitido uma melhoria significativa nas prevalências de tuberculose como expresso na figura 8. Mais especificamente por direção regional nos últimos cinco anos, a região Norte diminuiu de 0,33% para 0,15%, região Centro 0,63% para 0,14%, região Lisboa e Vale do

Tejo de 0,77% para 0,14%, a Região Alentejana 3,37% para 1,36% e a região do Algarve - realiza a vigilância de regiões indemnes de tuberculose bovina (Decisão 2012/204/EU de 19 de abril de 2012) (DGAV, 2017) .

Para 2025 é proposto pela DGAV alcançar a erradicação de tuberculose bovina, todavia tem existido algumas dificuldades nos últimos estadios de erradicação. Destacam-se, fatores como a sensibilidade da IDTC e a qualidade de execução da mesma (DG SANTE, 2016), o contacto de bovinos com outras explorações, e os reservatórios silváticos de *M. bovis* que têm sido uma preocupação crescente nos últimos anos.

Os javalis e os veados, considerados como principais hospedeiros reservatórios em Portugal têm apresentado um aumento populacional em grande escala, paralelo ao desenvolvimento da indústria da caça comercial que perpetua o desenvolvimento de animais silváticos pelo provisionamento de manejo artificial como locais de abeberamento, alimentação, cercas e por vezes medicação (Vieira-Pinto *et al.*, 2011).

Segundo um estudo Santos *et al.*, 2012 que calculou as prevalências de tuberculose em javalis e veados em estudos realizados na península Ibérica durante os anos 2004-2011 concluiu que a prevalência bTB de javalis é de 36% e de veados 21%, o que vem corroborar o elevado risco presente de certas regiões na transmissão da doença aos efetivos, devido à sobrepopulação de veados e javalis. Este facto é especialmente importante em explorações onde predomina o manejo extensivo de bovinos, onde há maior probabilidade de ocorrer partilha da pastagem com espécies silváticas.

Na perspetiva de interromper o ciclo de contaminação entre animais e promover a recolha de dados para enquadramento do problema, a DGAV em 2011 redigiu um “Plano de Controlo e Erradicação da Tuberculose em Caça Maior” com o objetivo de divulgar e consciencializar as entidades intervenientes (DGAV, 2011) .

Ainda que existam várias medidas integradas para debelar a tuberculose bovina, os detentores de gado devem salvaguardar os animais do contato direto com animais de outras explorações e de espécies silváticas bem como utilizar os códigos de boas práticas na exploração pecuária e normas de biossegurança (DGAV, 2017).

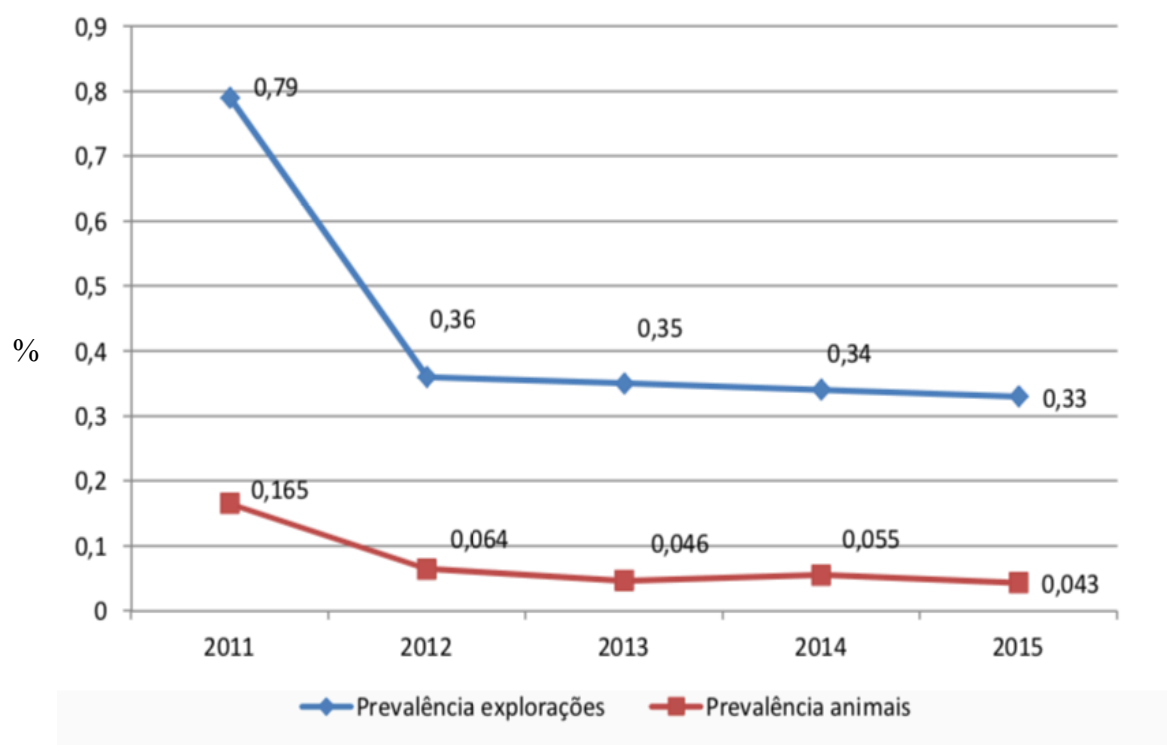


Figura 8: Prevalências de bTb em bovinos e respetivas explorações nos anos 2011-2015, DGAV 2017

6 Análise de redes sociais: rede de movimentos de bovinos

Na epidemiologia veterinária, os métodos de análise de redes sociais são presentemente usados para estudar a relação da movimentação de animal e a disseminação de doenças. Na tuberculose bovina estão descritas múltiplas vias de transmissão que influenciam a disseminação de *Mycobacterium bovis*, nomeadamente a via de transmissão de curto alcance, onde se inclui o contato direto entre bovinos de explorações vizinhas, a infeção através de animais silváticos ou mesmo uma infeção persistente derivado de um histórico de bTB na exploração. A via de transmissão de grande alcance, incide principalmente sobre as trocas comerciais de bovinos entre explorações, pela capacidade de se realizar movimentos de bovinos a grandes distâncias. Esta via, reflete parâmetros mais sólidos de se analisar, por ser possível rastrear todos os movimentos de bovinos realizados. (Ortiz-Pelaez *et al.*, 2006; Palisson *et al.*, 2016). A nível nacional é levado a cabo, pela plataforma informática SNIRA, projetada para identificação de ungulados domésticos e controlo e registo sistemático da movimentação animal.

Foi possível partir do registos do SNIRA, conjugar conceitos desenvolvidos para análise de SNA (*Social Network Analysis*) de modo a avaliar parâmetros, que permitem caracterizar cada membro da rede, bem como a própria rede (Scott, 2011)

Num contexto de rede de movimentos de bovinos, os estabelecimentos onde se encontram bovinos (ex: explorações, leilões, praça de touros, matadouros) são representados por nós, e os movimentos de animais entre esses estabelecimentos são representados por arestas. Ao conjunto das ligações de nós e arestas é chamado grafo (figura 9) (Bigras-Poulin *et al.*, 2006; Palisson *et al.*, 2016).

As arestas podem ser direcionadas ou não direcionadas, dependendo do objetivo do estudo. Numa aresta direcionada, cada nó apresenta dois graus: um grau de entrada (*In-Degree*) e um grau de saída (*Out-Degree*) que são, respetivamente, os números de arestas que chegam ao nó e que partem dele (Ossada, 2015).

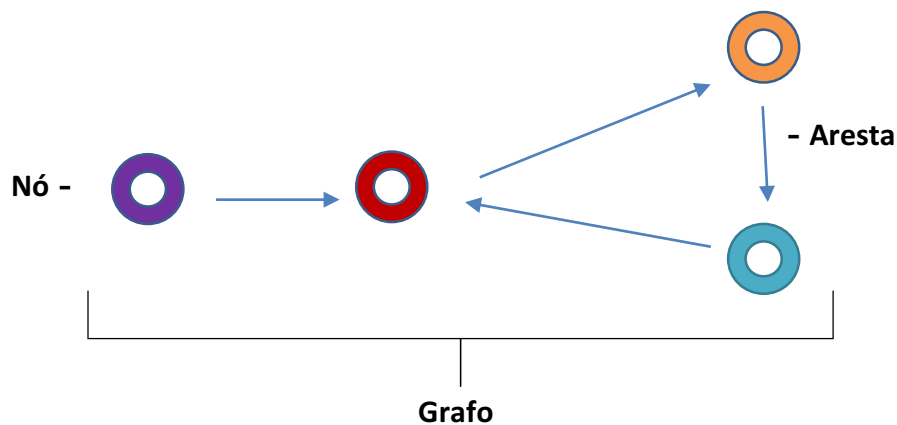


Figura 9: Representação de um grafo fictício de uma rede de trocas comerciais de bovinos. Os nós (círculos coloridos) representam as explorações; as arestas direcionadas (setas) representam a direção do movimento, o conjunto de nós e arestas interligados é designado por grafo.

Strength (força) ou grau ponderado é a quantidade transacionada entre estabelecimentos, e pode ser definido por lotes ou animais. São representados por “ s_{in} ” para compras realizadas num estabelecimento e para vendas “ s_{out} ” (R. Cipullo, 2013).

Outro fator a ter em conta é o intervalo temporal, a rede é considerada estática, se se considerar todos os estabelecimentos conectados, em detrimento da lógica temporal. Ou dinâmica se segmentarmos as conexões entre estabelecimentos tendo em consideração o intervalo temporal (Vernon & Keeling, 2009)

Outros elementos descritivos de uma SNA que permitem caracterizar a rede de comercialização de bovinos entre estabelecimentos são eles os indicadores de centralidade definidos por *Betweenness*, *Closeness*, *Clustering Coefficient*, *Eccentricity* e *PageRank*, *Modularity*, *Shorter path*, *Ingoing/Outgoing Contact Chain* (Kunegis, 2014; Cipullo et al., 2016)

Betweenness (intermediação) - É uma medida de centralidade que quantifica o número de vezes que um nó age como uma “ponte” ao longo do caminho mais curto entre dois outros nós. Esta medida que avalia a intermediação, é útil para analisar a dinâmica de comunicação da rede. Por exemplo, estabelecimentos bovinos com elevado *betweenness* têm considerável influência sobre uma rede de movimentação de animais, a sua remoção por sequestro da exploração ou abate do efetivo pode levar à fragmentação da rede (Cipullo *et al.*, 2016).

Closeness (proximidade)- O *closeness* mede o quanto um determinado nó está próximo dos demais nós da rede. Esta medida calcula os caminhos mais curtos (distância geodésica) entre todos os nós, em seguida, atribui a cada nó uma pontuação baseada na soma de caminhos mais curtos. A proximidade pode ajudar a encontrar ‘bons emissores’, todavia, numa rede altamente conectada os nós podem apresentar pontuações similares. Assim é provável ser mais vantajoso encontrar influenciadores em clusters (conjunto de estabelecimentos com maior ligação entre si)(Oliveira & Gama, 2012; R. I. Cipullo *et al.*, 2016)

Clustering Coefficient (coeficiente de aglomeração) - O coeficiente de aglomeração, é considerado um quantificador de nós triplos formados na rede, isto é, calcula o número conjuntos de três nós conectados uns aos outros a partir de um nó. Em redes direcionadas, é possível calcular o coeficiente de aglomeração de entrada e o coeficiente de aglomeração de saída. O valor do coeficiente de aglomeração varia de 0 a 1, sendo que, quando atinge o valor 1, todos os vizinhos desse nó possuem conexões entre si (em ambos os sentidos) (Cipullo *et al.*, 2016).

PageRank- O *PageRank* é um algoritmo de análise de conexões em redes utilizado no motor de pesquisa do *Google*, que se baseia na premissa de que nós importantes recebem ligações de nós importantes. O algoritmo atribui um valor da importância relativa de cada nó da rede (valor de *PageRank*), considerando a quantidade de arestas que determinado nó recebe (grau de entrada) e também a quantidade de arestas que seus vizinhos recebem (Oliveira & Gama, 2012; Cipullo *et al.*, 2016)

Eccentricity (excentricidade)- A excentricidade é uma medida que calcula a distância máxima de um nó a outros nós na rede, ela também pode ser definida como uma medida de não centralidade (Kunegis, 2014).

Modularity (modularidade)- É um algoritmo que permite a detecção de comunidades ou também chamado *clusters* de uma rede. A identificação tem como base, analisar conjuntos de nós, e verificar as interligações mais densas, relativamente a outros na rede.(Gong, Li *et al.*, 2016) . A lógica inicia-se por adicionar a cada nó uma comunidade e, posteriormente, são analisados todos os nós vizinhos, calculando a existência de um ganho na modularidade ao retirar n nós da sua comunidade x e incluir em outra comunidade y (Ferreira, 2013).

Shortest path (caminho mais curto) – O *Shortest path* é calculado através do algoritmo *Dijkstra* que permite identificar a sequência de nós mais curta possível, entre um nó na rede e outro nó, esta medida pode ser calculada tendo em conta se a rede é estática ou dinâmica.(Gong *et al.*, 2016)

Ingoing/Outgoing Contact Chain – São medidas de rede que levam em consideração a sequência temporal dos movimentos e combinam informações sobre os contactos que os estabelecimentos realizaram durante esse intervalo. São ideais para o rastreamento anterior e posterior de contactos através de movimentos de animais vivos durante um foco (Nöremark & Widgren, 2014).

Estes indicadores de centralidade facilitam a compreensão da rede de movimentação animal, através da caracterização e distribuição dos diversos tipos de estabelecimentos (nós) na rede. A nível individual, é possível também analisar os indicadores de centralidade de cada nó na rede e, portanto, perceber quais apresentam maior participação na rede e consequentemente são mais influentes. Na tabela 3 estão resumidas as fórmulas aplicadas aos indicadores de centralidade.

Indicadores de centralidade	Fórmulas	Descrição
In- Degree	$k_i^- = \sum_{j=1}^n a_{ij}$	aij - somatório número de arestas de entrada conectadas ao nó <i>i</i>
Out-Degree	$k_i^+ = \sum_{j=1}^n a_{ji}$	aij - somatório número de arestas de saída conectadas ao nó <i>i</i>
Betweenness	$b_v = \sum_{s,t \in V(G) \setminus v} \frac{\sigma_{st}(v)}{\sigma_{st}}$	σst -numero do total de distâncias mais curtas do nó <i>s</i> para <i>t</i> ; σst(v) -numero de caminhos mais curtos que passam pelo nó <i>v</i>
Closeness	$Cl_v = \frac{n-1}{\sum_{u \in V(G) \setminus v} d(u,v)}$	d(u,v) - distância geodésica entre o nó <i>u</i> e <i>v</i> ; n - número de nós da rede
Clustering Coefficient	$CA_i = \frac{1}{(k_i)(k_i-1)/2} \sum_{j,k} a_{ij} a_{ik} a_{jk}$	CA -número de triângulos formados n rede; i -nó ; ki -graus vizinhos de <i>i</i>
PageRank	$PR(u) = \sum_{v \in B_u} \frac{PR(v)}{L(v)}$	u – nó; Bu - conjunto contendo todos os nós vinculados ao nó <i>u</i> ; v - nó contido no conjunto Bu ; L(v) – número de ligações a um nó <i>v</i>
Eccentricity	$\epsilon_v = \max_{i \in V(G) \setminus v} d(v,i)$	max - maior; d(v,i) - distância geodésica entre o nó <i>v</i> e <i>i</i>
Modularity	$Q(P,G) = \langle N, E \rangle = \sum_{C_i \in P} \frac{l(C_i)}{ E } - \left(\frac{d(C_i)}{2 E } \right)^2$	P -cluster (conjunto de nós); G - Rede; n –nó; N - conjunto total de nós; v - nós vizinhos da rede; Ci - classe de cluster; l(Ci) -número de ligações que ligam os nós dentro de <i>Ci</i> ; d(Ci) -Grau de <i>Ci</i>
Shortert path	<i>Dijkstra's Algorithm</i>	

Tabela 3: Resumo das fórmulas dos indicadores de centralidade

CAPITULO 2: TRABALHO EXPERIMENTAL

1 Objetivos

1.1 Objetivos gerais

Neste trabalho experimental, aborda-se a problemática da tuberculose bovina em Portugal numa nova perspetiva, nomeadamente a utilização de ferramentas de estudo inovadoras que integram os registos de movimentação de bovinos, com o sentido de produzir uma rede de movimentos de bovinos que visam futuramente, melhorar a eficiência do controlo de doenças infecciosas. É então objetivo geral deste trabalho, estudar a dinâmica de movimentos de bovinos de explorações positivas à tuberculose bovina em Portugal e relacioná-las com parâmetros de análise genéticos e de distância.

1.2 Objetivos específicos

1. Caracterização dos *spoligotypings*.
2. Relacionar a proximidade genética entre os padrões de *spoligotypings*.
3. Geolocalização dos *spoligotypings*.
4. Identificação e geolocalização dos focos de tuberculose bovina.
5. Relacionar a distância euclidiana entre explorações com focos de bTB e a distância euclidiana entre zonas de caça com focos de bTB.
6. Caracterização da rede de movimentos de trocas comerciais de bovinos.
7. Identificação de casos relevantes de ligações diretas entre explorações com focos de bTB
8. Relacionar a proximidade de trocas comerciais entre explorações com focos de bTB.
9. Análise dos padrões de *spoligotyping* mais frequentes em explorações.
10. Avaliação a relação entre a proximidade genética e a distância euclidiana das zonas de caça com focos de tuberculose bovina.
11. Avaliação da relação entre a proximidade genética, distância euclidiana e a proximidade comercial das explorações com focos de tuberculose bovina.

2 Materiais e métodos

2.1 Introdução

O ponto de partida deste estudo centrou-se numa base de dados cedida pelo LNIV no qual constam os registos de animais positivos a tuberculose bovina. Estes registos incluíam informações relevantes para o estudo nomeadamente: a espécie, o número da zona de caça ou o código de exploração onde ocorreu o foco, as lesões recolhidas do animal, e a data da colheita das lesões.

O trabalho foi estruturado em 3 fases: *Spoligotyping* de animais positivos a bTB, geolocalização dos focos e construção de uma rede de trocas comerciais entre explorações de bovinos. Foi posteriormente finalizado, relacionando a relação dos valores obtidos dessas três fases. Para uma melhor compreensão do estudo, está representado um fluxograma do trabalho na figura 10.

2.2 Spoligotyping

2.2.1 Amostra:

A partir das bases de dados do LNIV foram estabelecidos alguns critérios de inclusão e exclusão, de modo a constituir-se uma amostra para análise molecular por spoligotyping, os critérios foram:

As espécies elegidas para o estudo contemplam bovinos, veados e javalis num intervalo temporal de 1 de Janeiro de 2013 a 31 de Dezembro de 2014, com positividade a *Mycobacterium bovis*. Devido ao elevado número de silváticos, e com o objectivo de minimizar alguns custos, estabeleceu-se que nas zonas de caça que apresentassem elevado número animais positivos a bTB, seleccionava-se aleatoriamente pelo menos dois indivíduos, preferencialmente de espécies diferentes.

Outro critério estabelecido foi a validação da informação nas diferentes bases de dados, por outras palavras, o número da zona de caça ou código da exploração do LNIV deveriam estar concordantes com as bases de dados do ICNF e da DGAV.

Durante o procedimento do *spoligotyping*, ocorreram algumas situações que excluíram alguns isolados do estudo, nomeadamente a ausência de ADN em 3 isolados e a presença de um padrão de *spoligotyping* novo.

Assim, depois de implementado os critérios acima mencionados foram realizados *Spoligotyping* a 210 isolados e validados 206.

2.2.2 Tratamento de dados:

Na caracterização dos *spoligotypings*, utilizaram-se ferramentas do programa R Studio®, como pacote de produção gráfica, “ggplot2”. Primeiramente quantificou-se o número da amostra por espécie, posteriormente, os padrões de *spoligotyping* por bovinos e por silváticos, assim, foi possível analisar quais os padrões mais frequentes.

Dos resultados dos padrões de *spoligotyping*, produziu-se uma tabela no Excel® com 43 colunas, relativas aos resultados das 43 sequências oligonucleotídicas da membrana de hibridação dos produtos de PCR. Esses resultados foram apresentados num modelo binário em que 0 correspondia à ausência do espaçador, ou 1 à presença. Exportou-se essa tabela de dados para o RStudio®, e transformou-se numa matriz, de forma a ser calculado o índice de Jaccard pela função “dist.binary” do pacote ADE4, ($J(A,B) = |A \cap B| / |A \cup B|$), finalizou-se com a função “hclust” do pacote “stats” do R®, no sentido de produzir um dendrograma que permite observar a proximidade genética entre as diferentes estirpes.

2.3 Georreferenciação

2.3.1 Dados:

No processo de obtenção dos dados, foi necessário aceder aos registos do LNIV e identificar as explorações e zonas de caça onde ocorreram os focos de tuberculose bovina de 2013 a 2014.

Na geolocalização das explorações, acedeu-se à plataforma SNIRA no qual se obteve os centroides de 88 explorações. Neste processo foi necessário validar na DGAV alguns códigos de explorações.

Nas zonas de caça foi realizado um pedido ao ICNF, que gentilmente disponibilizou os centroides das 66 zonas de caça onde ocorreram os focos.

2.3.2 Tratamento de dados:

Os dados obtidos foram manipulados inicialmente numa tabela em Excel®, no qual foi necessário transformar as coordenadas geográficas de graus, minutos e segundos para graus decimais. Seguidamente esta tabela foi exportada para o programa de referenciação geográfica Qgis®, onde se procedeu à construção de um mapa com as respetivas localizações dos focos de tuberculose bovina em explorações e zonas de caça.

A partir do Qgis®, foi possível construir uma matriz de distâncias euclidianas, que permite medir as distâncias mais curtas entre todos os focos de bTB. Esta matriz foi exportada para R®, no qual foram contruídos dois *heatmaps* através do pacote “ggplot2” do R® que representam as distâncias entre explorações e as distâncias entre zonas de caça.

2.4 Rede de Movimentos de Bovinos

2.4.1 Dados:

Os dados foram adquiridos a partir da plataforma SNIRA no qual constam os registos de movimentação animal. Foi também utilizado a informação contida na base de dados do LNIV para a construção da rede de movimentos de bovinos.

Das 88 explorações onde ocorreram focos de tuberculose bovina, obteve-se a informação dos registos de movimentos de 73 explorações. A exclusão das restantes deve-se ao facto de não apresentarem registos de movimentação, ou não estarem contemplados os movimentos no filtro temporal aplicado.

2.4.2 Construção da base de dados da rede de movimentos de bovinos:

No processo criação da rede de movimentos de bovinos, foi necessário realizar várias etapas. A primeira etapa cingiu-se em transferir a base de dados do SNIRA com os movimentos de todos bovinos, posteriormente delimitou-se o espaço temporal que contempla os anos 2012 a 2014.

Com o objetivo de utilizar apenas movimentos entre explorações, foi necessário excluir outros estabelecimentos de bovinos como por exemplo leilões e mercados, para esse efeito, gerou-se um código PL/SQL no programa pgAdmin 4® que permitiu ligar diretamente movimentos entre explorações, tendo em conta as datas das movimentações.

Com o resultado obtido anteriormente, procedeu-se a outras transformações com base nas explorações da base de dados do LNIV e ajuda dos pacotes de R® “dplyr”, que, incluíam as seguintes condições:

A partir dos focos (explorações da base de dados do LNIV) filtrou-se a base de dados e acrescentou-se um critério temporal, que se apresenta, pela data do dia da colheita da amostra tecidular representativo de cada foco até 365 dias anteriores a essa data, o que permitiu criar os movimentos diretos de outras explorações a cada foco. A partir daí, replicou-se o mesmo critério para as explorações seguintes, o que proporcionou a conceção de uma rede de movimentos com cinco graus de distância.

2.4.3 Rede de movimentos de bovinos e indicadores de centralidade:

A base de dados foi posteriormente finalizada através de alguns parâmetros pré-calculados com o pacote do R® “EpiContactTrace” e exportada por intermédio do pacote de R® “igraph” para programa de visualização e análise de redes Gephi®, onde é possível visualizar todas conexões das explorações e calcular os medidores de centralidade da rede e de cada exploração integrante.

Com o objectivo de medir a proximidade de trocas comerciais que as explorações com focos de tuberculose bovina detinham entre elas, gerou-se uma matriz de proximidade de trocas comerciais, que avalia quantas explorações intermediárias são necessárias para que duas explorações com focos de bTB comuniquem, tendo em conta, a direcção do movimento. Foi necessário recorrer ao pacote de R “igraph” para medir todas as distâncias possíveis entre todas as explorações da rede de movimentos de bovinos e posteriormente filtrou-se com o pacote “dplyr” do R as explorações foco.

Para se obterem os valores dos indicadores de centralidade, extraíram-se os dados individuais de todas as explorações integrantes na rede de movimentos, através do programa Gephi®, posteriormente realizaram-se as estatísticas descritivas com fórmulas de estatística nativas do R de modo a verificar a posição e dispersão dos indicadores da rede estudados.

2.5 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi abordado através da relação dos resultados obtidos nas várias etapas realizadas.

Para as explorações com focos de bTB, foi possível comparar três fatores nomeadamente, a proximidade genética através do índice de Jaccard, a distância entre explorações através de uma matriz de distância euclidiana e por fim a proximidade de trocas comerciais entre explorações, através de uma matriz que avalia a distância mais curta percorrida, tendo em conta a direcção do movimento. A estatística projetada para as explorações foi a correlação de *Spearman* através de funções de estatística nativas do programa R. De realçar que as explorações avaliadas na correlação requeriam estar presentes nas três fases efetuadas, pelo que a correlação foi construída através dos dados de 73 explorações.

Relativamente às zonas de caça, apenas se pôde relacionar a similaridade genética com a distância euclidiana com o R, no qual foram utilizadas 66 zonas de caça.

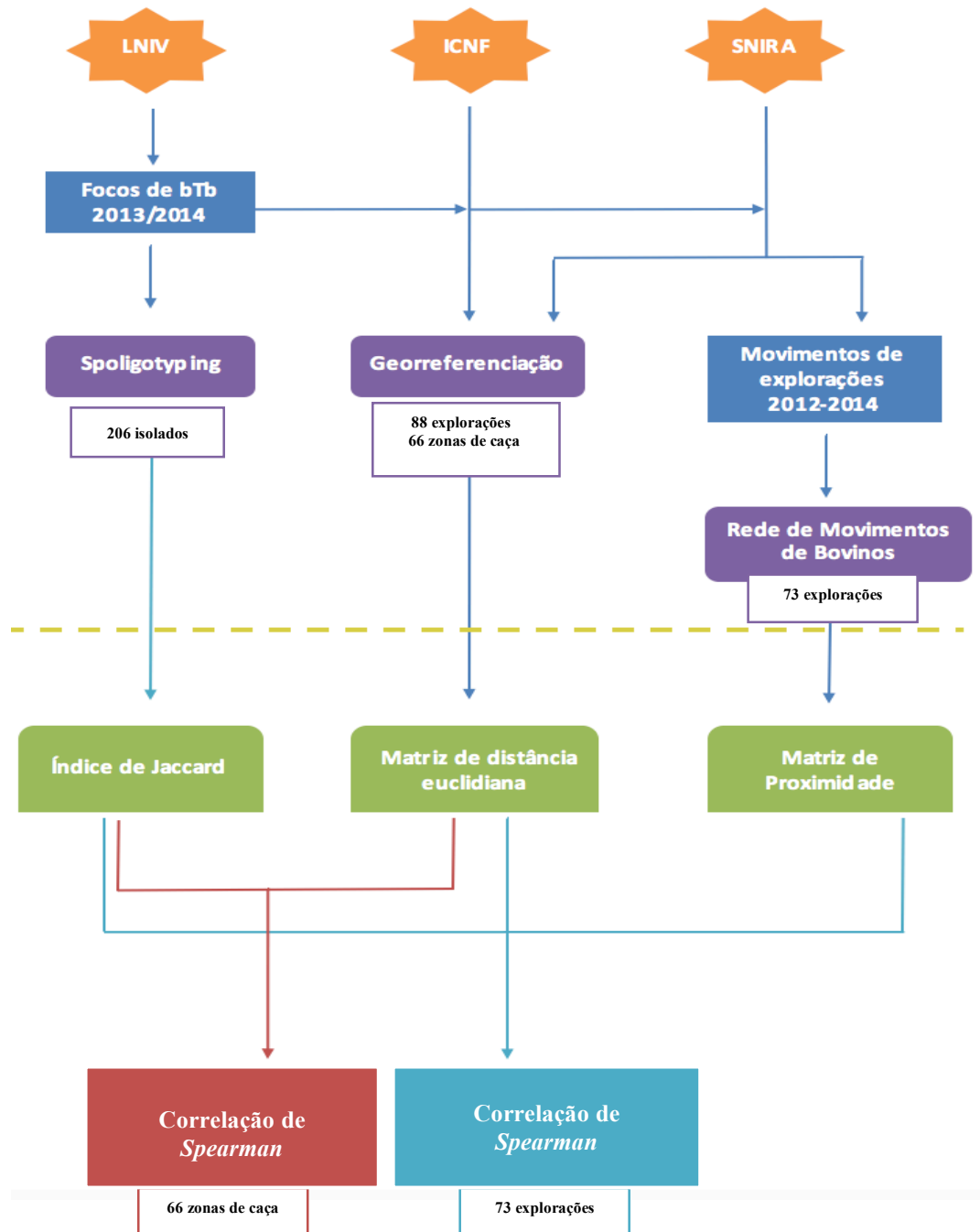


Figura 10: Fluxograma dos procedimentos do trabalho. Caixas laranjas- entidades detentoras das bases de dados. Caixas azuis- restrições aplicadas. Caixas roxas- etapas realizadas. Caixas verdes- resultado final das etapas. Caixa vermelho e turquesa- tratamento estatístico aplicado.

3 Resultados

3.1 Spoligotyping

3.1.1 Caracterização da amostra

Foi realizado spoligotyping a uma amostra de 206 indivíduos, no qual constam 113 bovinos e, 93 silváticos referentes a 53 javalis e 40 veados. A amostra refere-se aos indivíduos que apresentaram positividade a *Mycobacterium bovis* no período de 2013 a 2014 (gráfico 1).

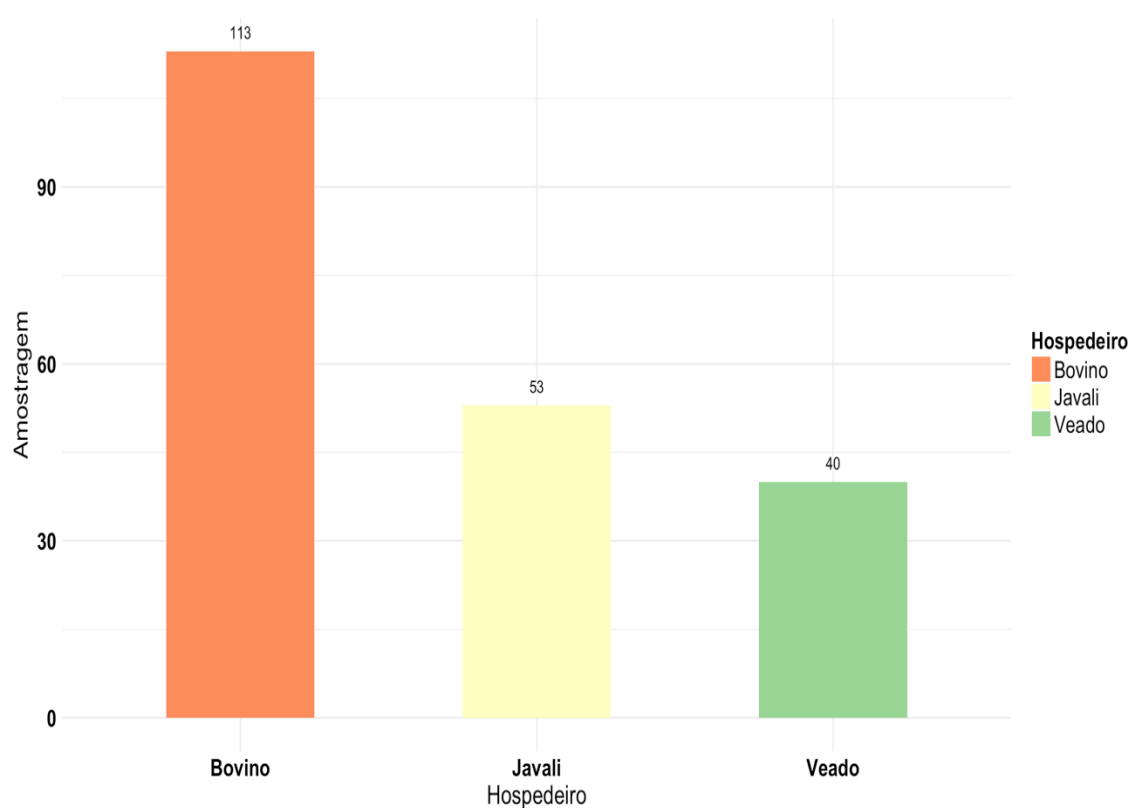


Gráfico 1: Representação gráfica por espécie, dos isolados utilizados para *spoligotyping* (n=206).

3.1.2 Caracterização dos spoligotipos

Foram encontrados 35 spoligotipos diferentes dos 206 isolados de *M. bovis* (gráfico 2). No conjunto das 3 espécies testadas o padrão SB1174 foi predominante, representando 18,9% dos resultados obtidos, sucede-se o SB0122 com 13,5% e o SB1264 com 7,3%. Por espécie, os bovinos apresentam como padrão mais frequente SB1095 que aparenta ser exclusivo da espécie, seguido também nas mesmas circunstancias, do SB0119. Outros padrões únicos nos bovinos são o SB0122, SB1090, SB1172 e SB1375. Os silváticos apresentam como padrões mais frequentes o SB1174, o SB1264 e o SB0122. Os padrões únicos que ocorrem nos silváticos, são retratados por apenas um foco. No caso dos javalis SB1572, SB1483 e SB0833 e nos veados SB1676, SB1483, SB1132 e, SB0961.

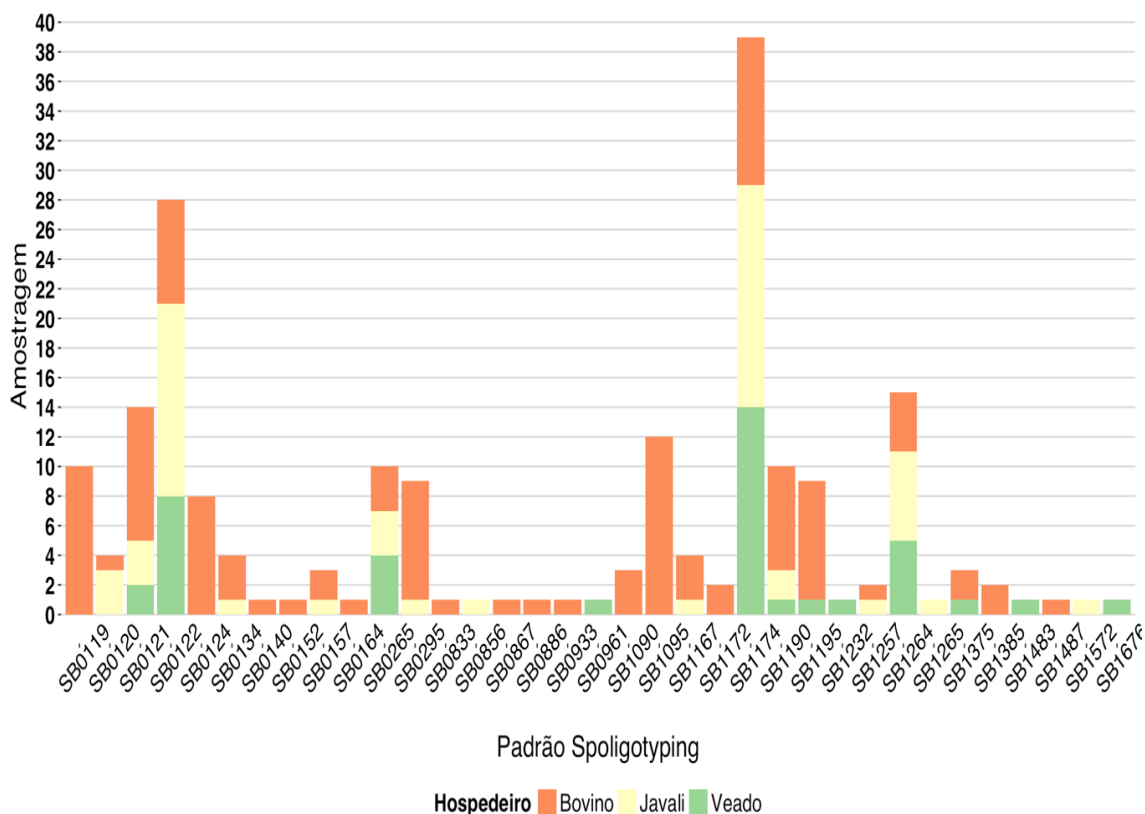


Gráfico 2: Padrões de spoligotyping representados por espécie (n=35). Resultados obtidos no período de 2013-2014.

3.1.3 Proximidade genética dos padrões de spoligotyping

Os resultados da proximidade genética entre os 35 padrões de *spoligotyping*, foram calculados através do índice de Jaccard e representados num dendrograma. Foi possível verificar a presença de cinco clusters, como apresentado no gráfico 3, correspondentes a cor azul, verde, amarela, vermelha e roxa, que representam os conjuntos de padrões de *spoligotyping* que partilham maior similaridade genética entre eles. Posteriormente realizou-se a distribuição geográfica das zonas de caça e explorações no mapa de Portugal, estando em consonância as cores dos padrões de *spoligotyping* do dendrograma de proximidade genética (figura 11).

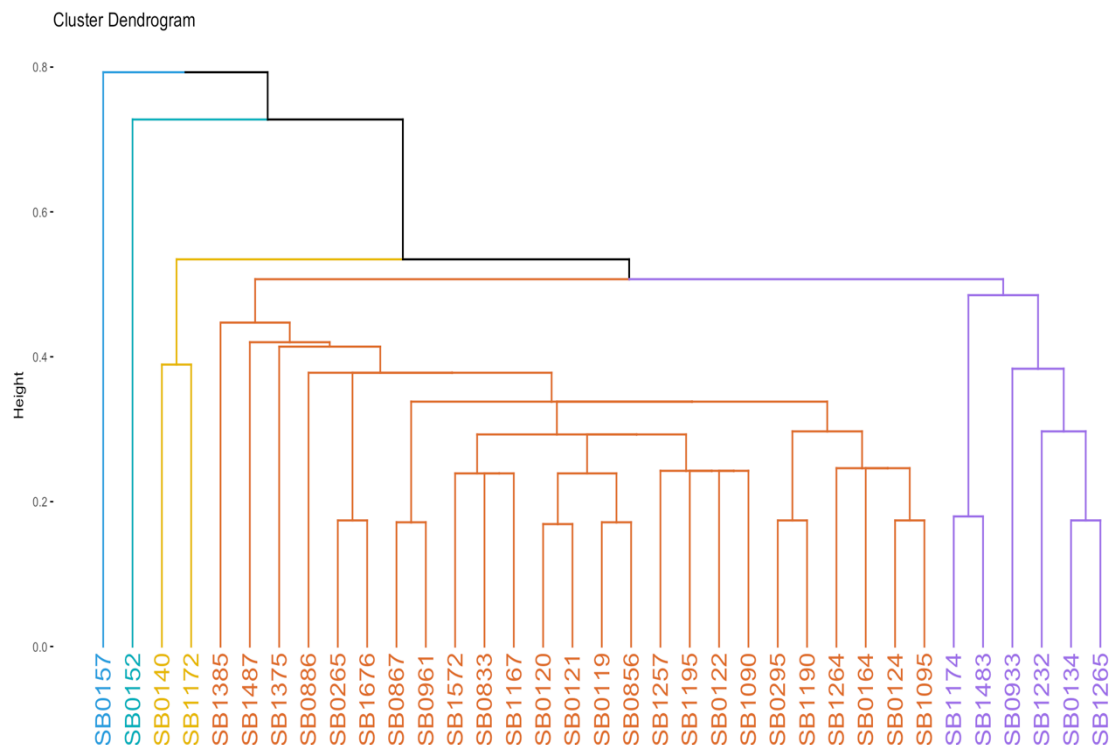


Gráfico 3: Dendrograma da proximidade genética dos padrões de spoligotyping (n=35) aferida pelo índice de Jaccard s. No gráfico são representados por diferentes cores cinco clusters. O índice de Jaccard é compreendido entre 0 e 1, quanto menor o índice maior a proximidade genética.

3.1.3.1 Geolocalização dos padrões de spoligotyping com base na proximidade genética

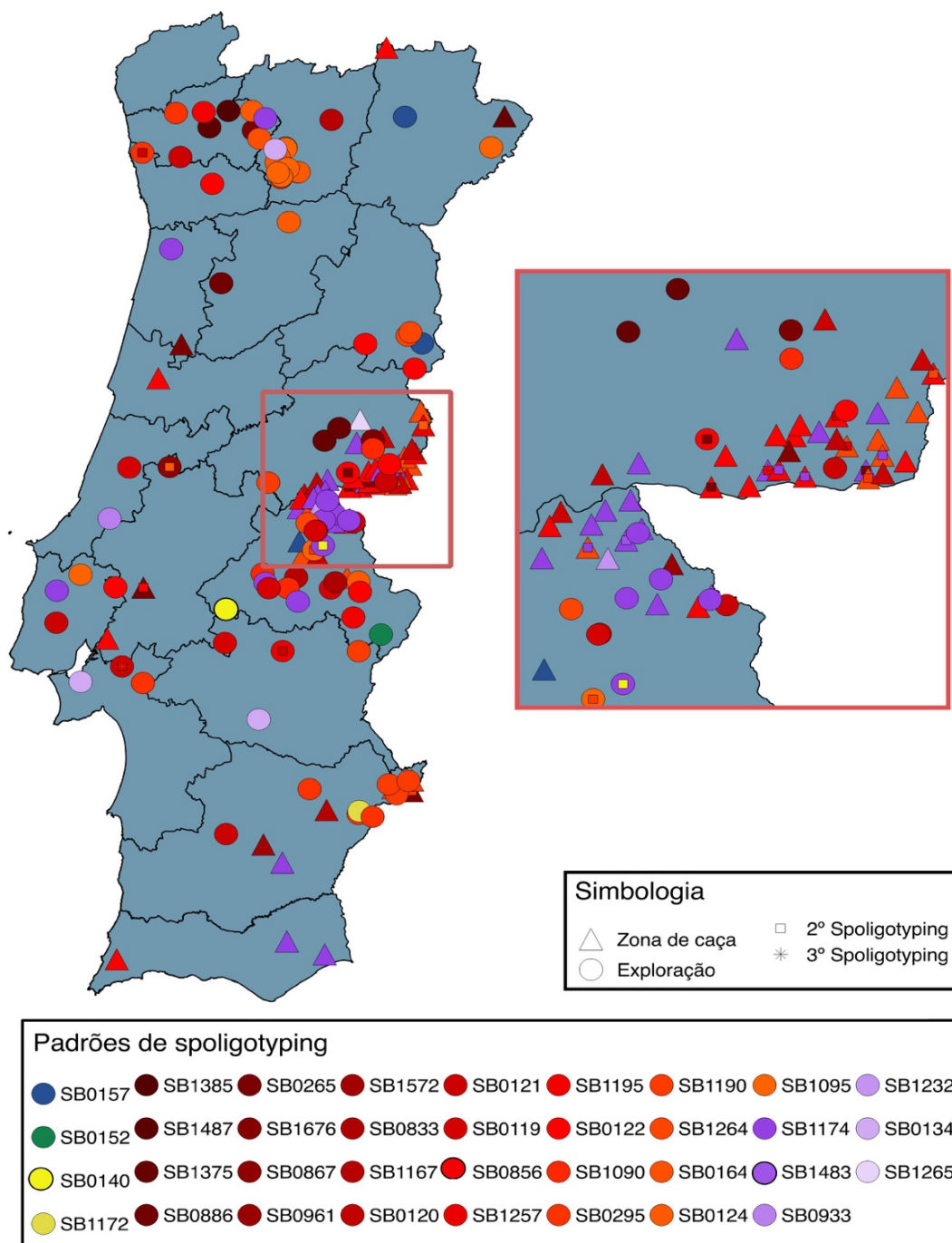


Figura 11: Distribuição geográfica das explorações e zonas de caça em Portugal, com os resultados de *spoligotyping*. As cores representadas nos padrões de *spoligotyping* estão de acordo com a proximidade genética representada no dendrograma (gráfico3).

3.2 Georreferenciação

3.2.1 Localização das Zonas de Caça e Explorações

Foram identificadas 66 zonas de caça e 88 explorações (figura 12). As zonas de maior densidade de focos de tuberculose bovina são as zonas pertencentes aos distritos de Castelo Branco e Portalegre, provenientes maioritariamente de animais silváticos. Destaca-se também a zona norte, com a particularidade de se registar focos de bTB exclusivamente em explorações, principalmente nos distritos de Vila Real e Braga onde ocorre maior aglomeração desses focos.

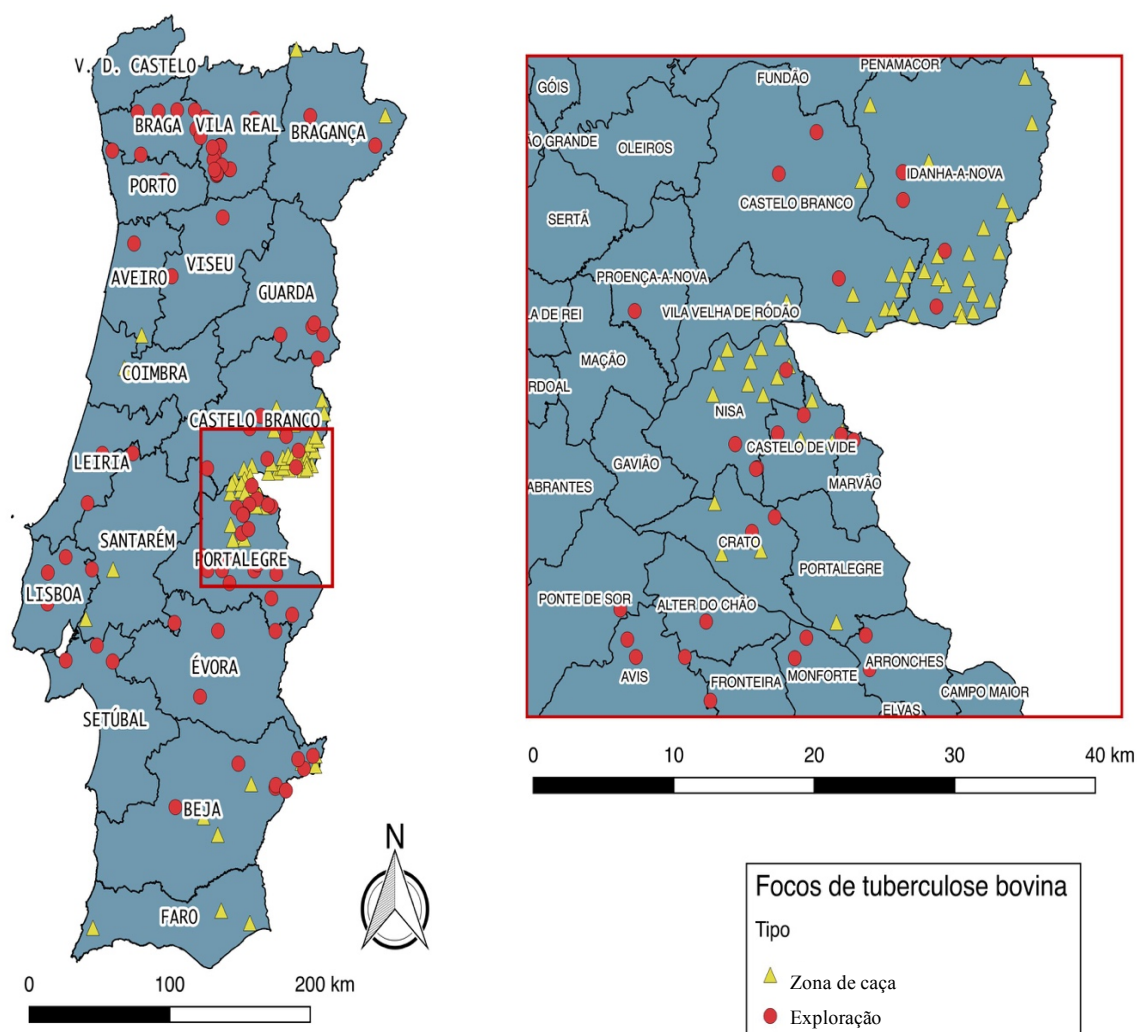


Figura 12: Distribuição Geográfica de focos de tuberculose em zonas de caça e explorações em Portugal nos anos 2013-2014.

3.2.2 Distância Euclidiana

Foram obtidas duas matrizes de distâncias euclidianas, que relacionam as distâncias entre focos de tuberculose bovina em explorações (gráfico 4.1) e focos de tuberculose bovina em zonas de caça (gráfico 4.2). Nos *heatmaps* é perceptível visualizar uma maior proximidade entre focos de zonas de caça comparativamente às explorações.

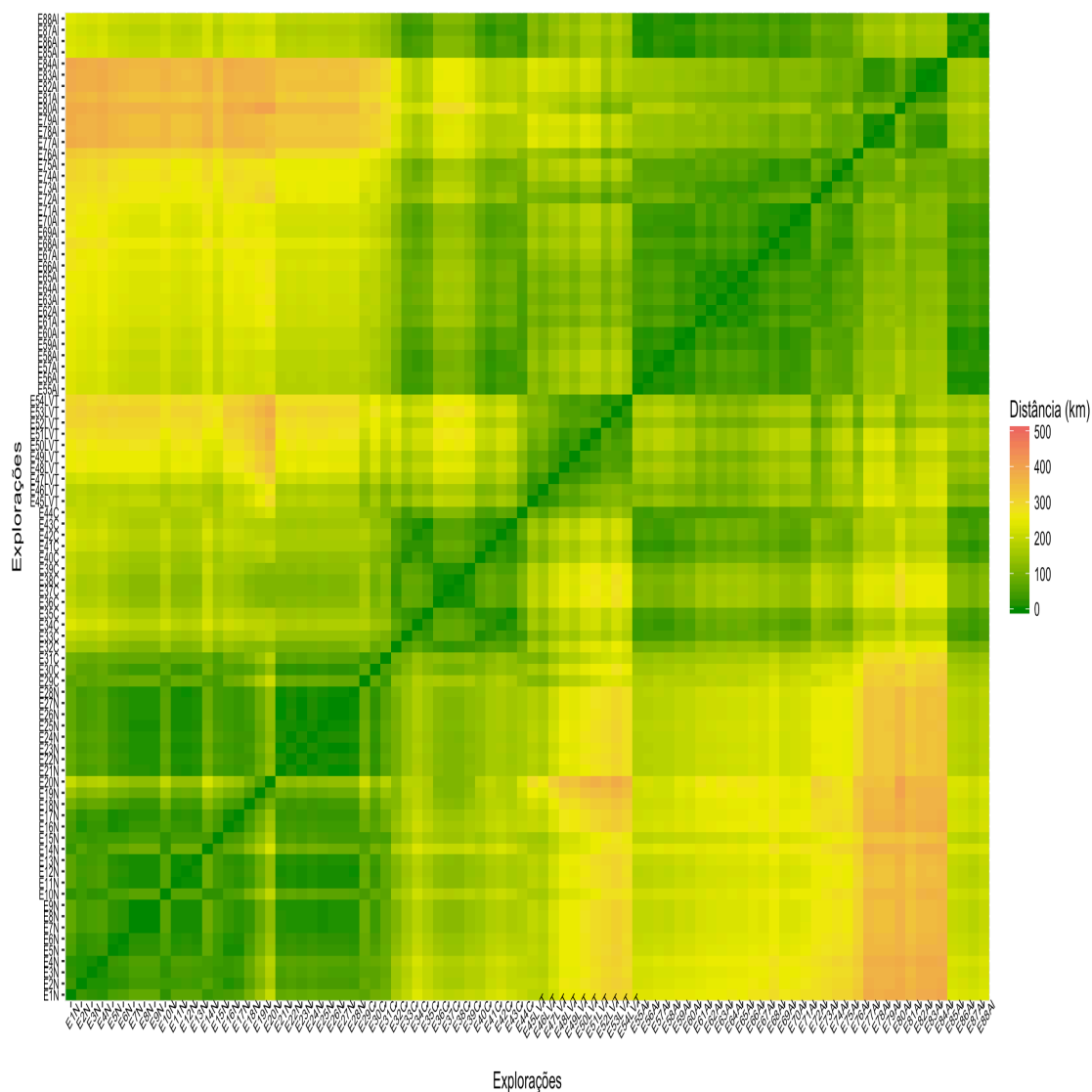


Gráfico 4: *Heatmap* de distância euclidiana entre explorações com focos de tuberculose bovina em Portugal, nos anos 2013 e 2014 (n=88). (N-norte; C-centro; LVT-Lisboa e vale do Tejo; Al- Alentejo)

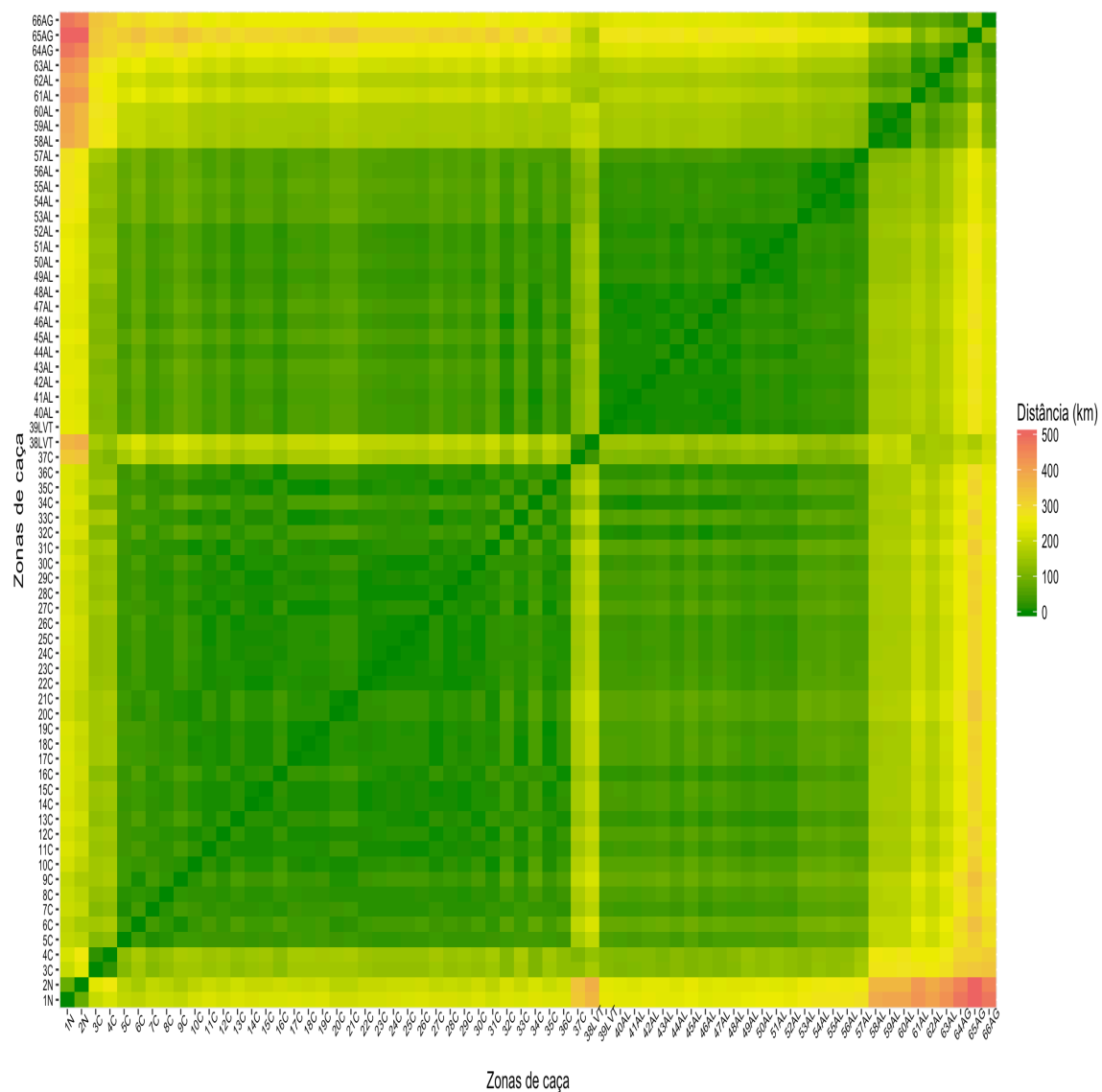


Gráfico 5: *Heatmap* de distância euclidiana entre zonas de caça com focos de tuberculose bovina em Portugal nos anos 2013 e 2014 (n=66). (N-norte; C-centro; LVT-Lisboa e vale do Tejo; Al-Alentejo; Ag- Algarve)

3.3 Rede de movimentos de bovinos

3.3.1 Caracterização da rede de movimentos de bovinos

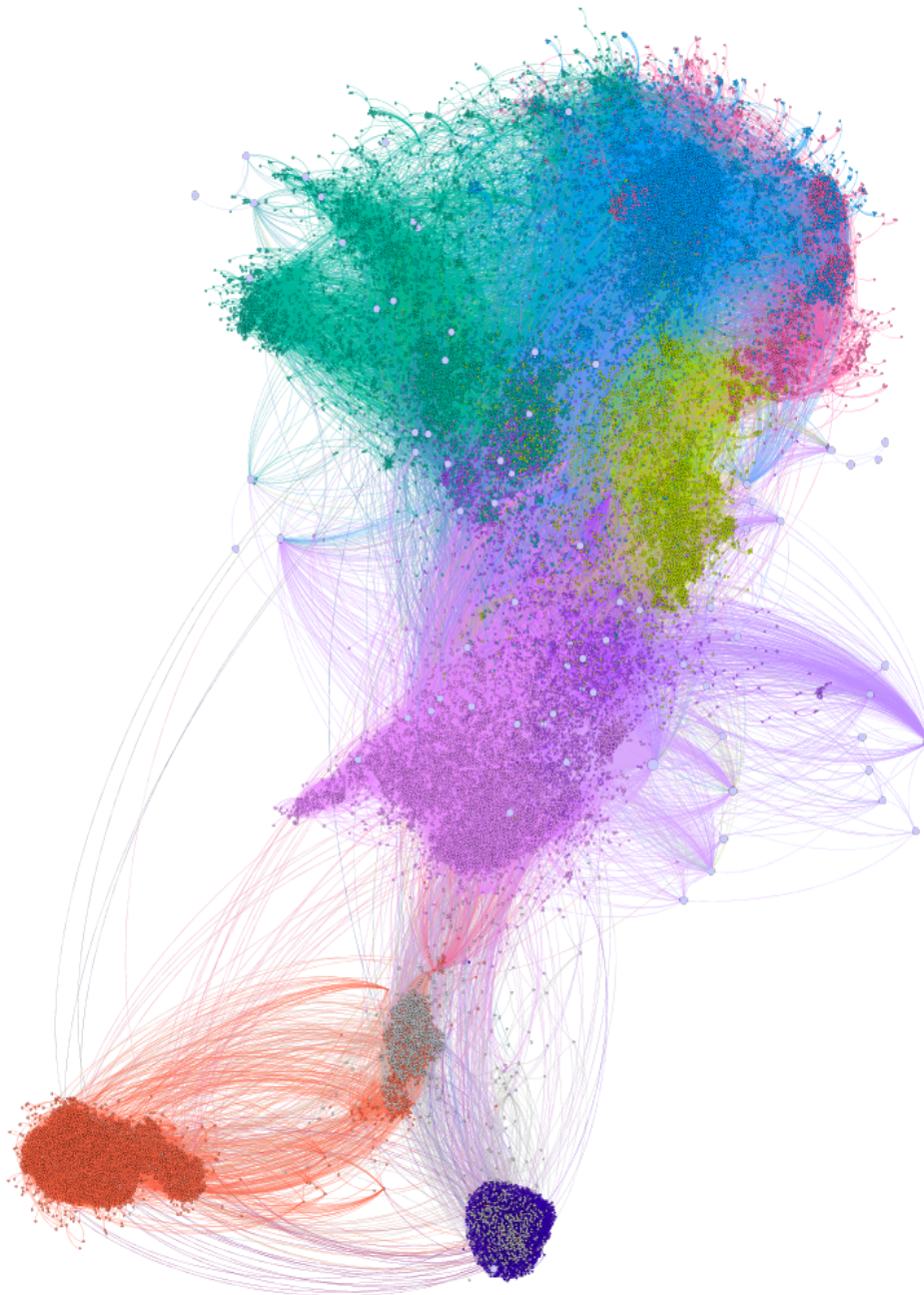


Figura 13: Rede de movimentos de bovinos entre explorações nos anos 2012 a 2014 em Portugal. Estão representadas 10 comunidades por cores. Os pontos referem-se às explorações ($n=31201$) de entre os quais, estão destacados a lilás as explorações com focos de tuberculose ($n=73$). As linhas apresentadas são referentes às ligações comerciais estabelecidas.

A rede de movimentos de bovinos (figura 13) é uma estrutura que retrata as trocas comerciais de bovinos realizados entre explorações nos anos 2012 a 2014 em Portugal.

Na rede estão representados 31201 nós correspondentes às explorações e 138931 arestas que correspondem as ligações entre explorações derivados de trocas comerciais de bovinos, nesse período de tempo. Os nós expressos de cor lilás e de maior dimensão, são nós referentes às explorações onde ocorreram focos de tuberculose bovina, que perfazem um total de 73 explorações.

A rede é uma rede direcionada, na figura é simbolizado por setas, estas definem a direção das trocas comerciais. Outra característica, é a rede ser estática devido, às ligações das explorações serem independentes do espaço temporal em que ocorre os movimentos dos bovinos.

Na rede é possível observar áreas delimitadas por cores diferentes, elas são definidas através da modularidade que permite identificar comunidades (clusters) com base na interação entre explorações. No gráfico 6 é possível visualizar a presença de 10 comunidades representadas pelas cores presentes na figura 13.

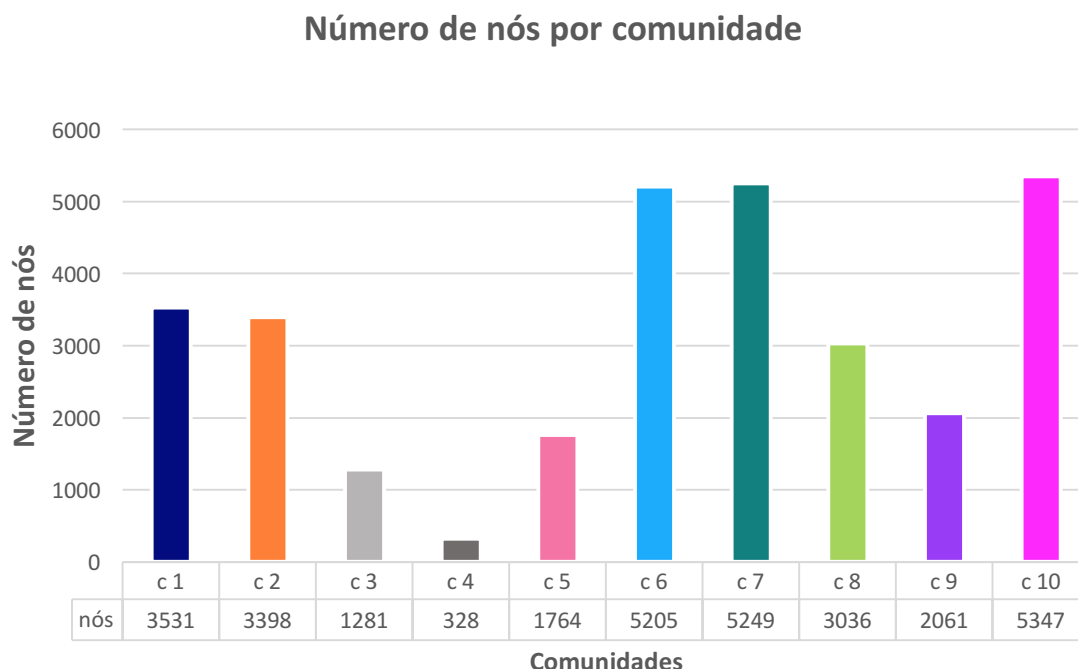


Gráfico 6: Modularidade da rede movimentos de bovinos. No gráfico estão presentes 10 comunidades com os respetivos integrantes de cada comunidade. As barras coloridas estão em concordância com as comunidades apresentadas na figura 13.

As comunidades ou *clusters* com maior representação na rede, apresentam-se pela comunidade 10 correspondendo a 17,14% da rede e localiza-se nas regiões do Baixo Alentejo, a comunidade 7 com 16,82% nas zonas de Vila Real e Centro mais concretamente, a zona da Guarda.

Conjuntamente as comunidades 6 e 5 com 16,68% e 5,18%, respetivamente, situam-se na região Norte nomeadamente nas zonas de Vila Real e Braga.

A comunidade 1, 2, 3 e 4 é composta pelo arquipélago dos Açores com um total de 27,37%. A comunidade 8 com 9,73% corresponde maioritariamente à região Centro. Por último a comunidade 9 com 6,61%, coincide maioritariamente com a região do alto Alentejo mais especificamente na zona de Portalegre.

3.3.2 Indicadores de centralidade da rede de movimentos de bovinos

Para analisar com maior profundidade a rede de movimentos de bovinos, foi necessário recorrer a diversos indicadores de centralidade que nos permitiram obter uma visão geral da rede e das explorações em particular.

Foram utilizados na rede de movimentos, indicadores de centralidade que estudam a dinâmica das ligações entre explorações de bovinos que se apresentam por: grau médio, o *clustering coefficient* (coeficiente de aglomeração), *betweenness* (intermediação), *closeness* (proximidade), *eccentricity* (excentricidade) e *pagerank*.

3.3.2.1 Grau médio

A primeira análise efetuada calcula o grau médio (*average degree*) da rede, que resulta da média do grau de entrada (*in-degree*) e do grau de saída (*out-degree*) de todas as explorações da rede. O grau médio nesta rede é de 4,453 e a suas distribuições de graus de entrada e graus de saída estão representados nos gráficos 7.1 e 7.2 onde é possível verificar que a maioria das explorações apresenta um baixo grau de saída e de entrada, no entanto, é possível verificar a existências de bastantes *outliers*.

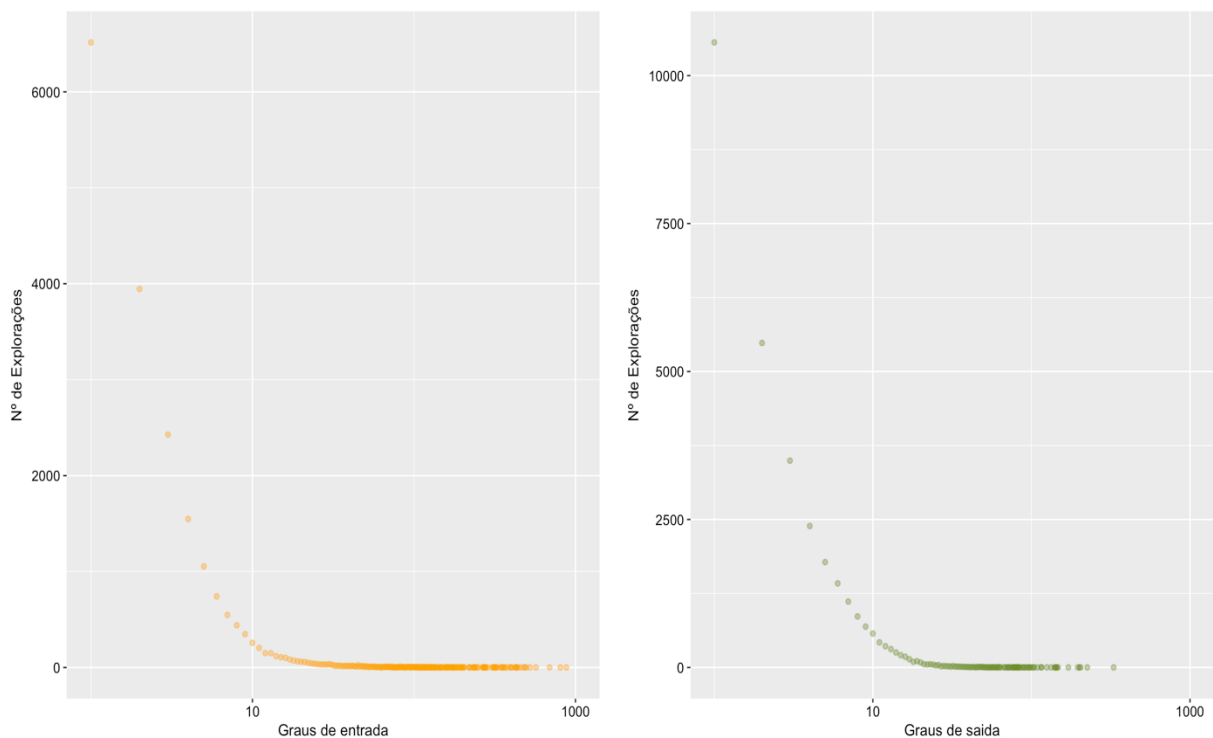


Gráfico 7.1 e 7.2: Representação dos graus de entrada por número de explorações e, graus de saída por número de explorações, respetivamente.

3.3.2.2 Clustering Coefficient

O coeficiente de aglomeração (CA) médio da rede, que resulta da média do CA de entrada (gráfico 8.1) e CA de saída (gráfico 8.2), é de 0.117. Este resultado revela que numa comunidade, existe em média cerca de 12% conexão aos vizinhos dessa comunidade.

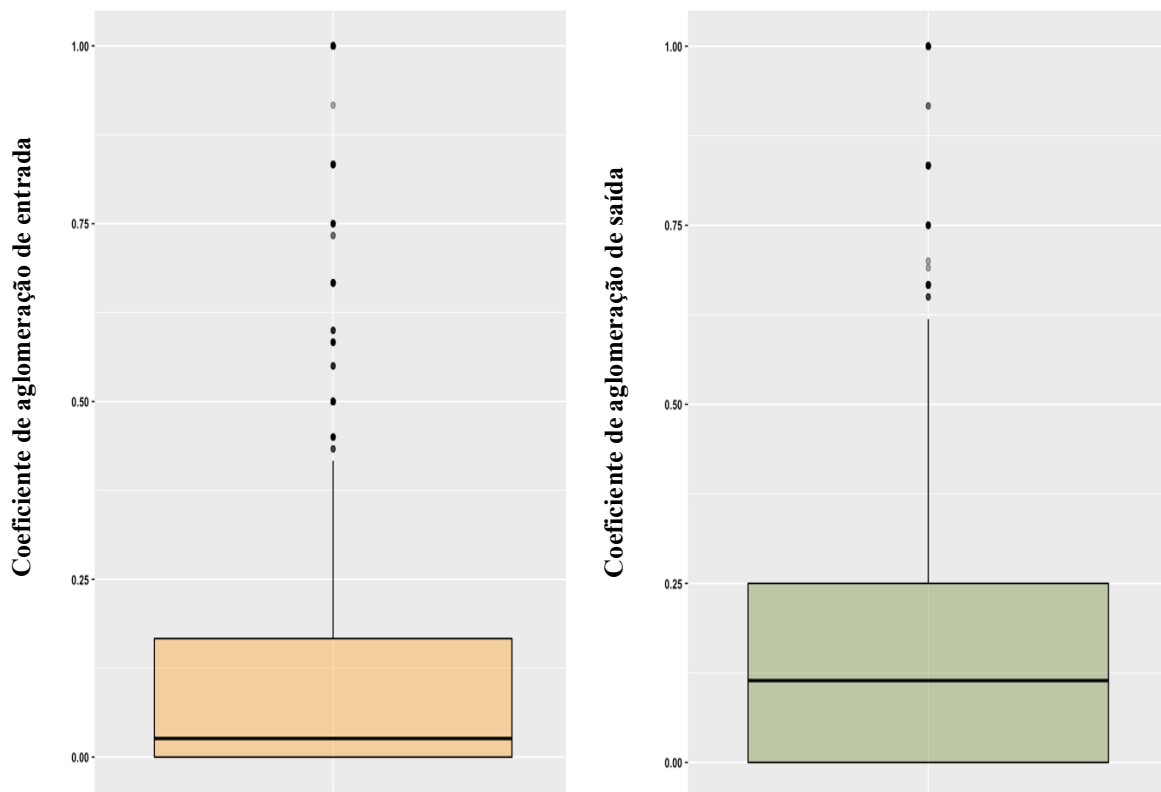


Gráfico 8.1 e 8.2: *Boxplots* com a representação do coeficiente de aglomeração de entrada e coeficiente de aglomeração de saída, respetivamente. O coeficiente de aglomeração varia entre 0 e 1.

3.3.2.3 Medidores de distância: *Betweenness*, *Closeness* e *Eccentricity*.

Os medidores de distância da rede são calculados através do *Betweenness*, *Closeness* e *Eccentricity*.

O *betweenness* (intermediação) médio dos nós é de 90898 por outras palavras, a média do número de vezes que um nó age como uma “ponte” ao longo do caminho mais curto entre dois nós é bastante elevada (gráfico 9).

O *closeness* (proximidade) médio da rede é 0,1574 o que traduz, que distância geodésica média de um nó para os demais da rede é bastante distante (gráfico 10).

O *eccentricity* (excentricidade) médio da rede é de 15,5 e indica que a distância média de um nó até ao nó mais distante é consideravelmente grande (gráfico 11).

Estes três medidores de distância permitiram concluir que em média na rede, é necessário passar por 6,42 nós para chegar de um determinado nó até outro.

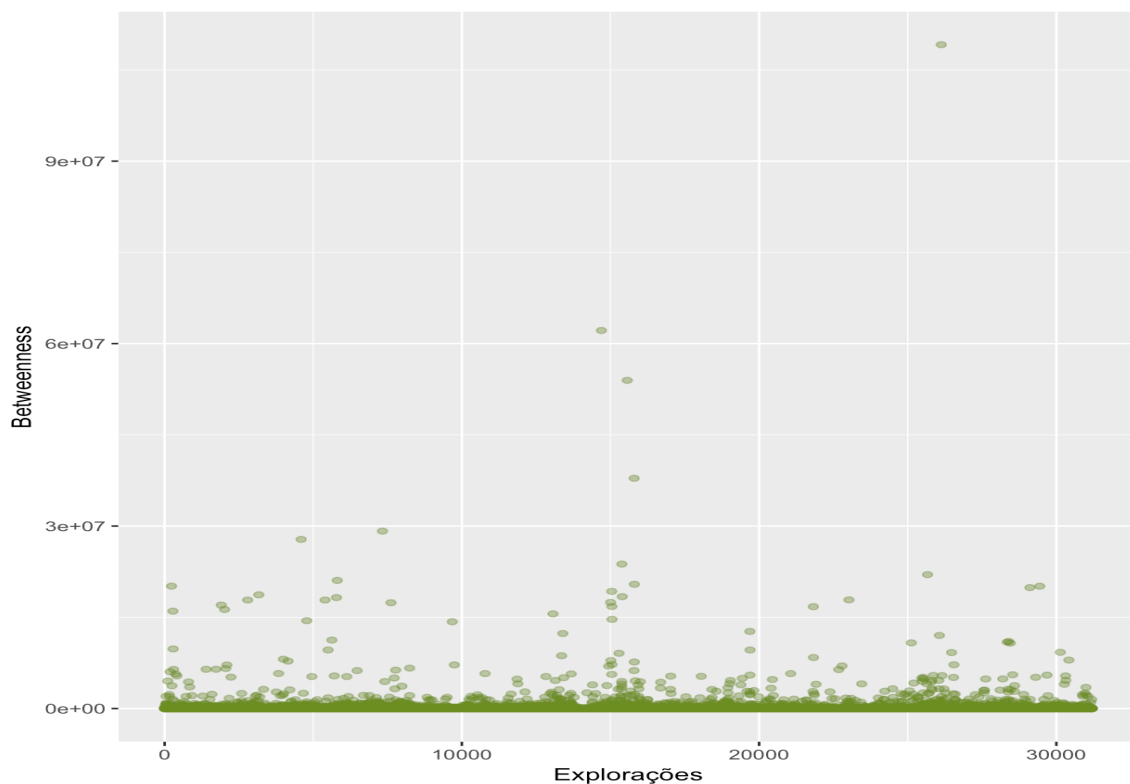


Gráfico 9: Distribuição do valor de *betweenness* (intermediação) pelas explorações da rede.

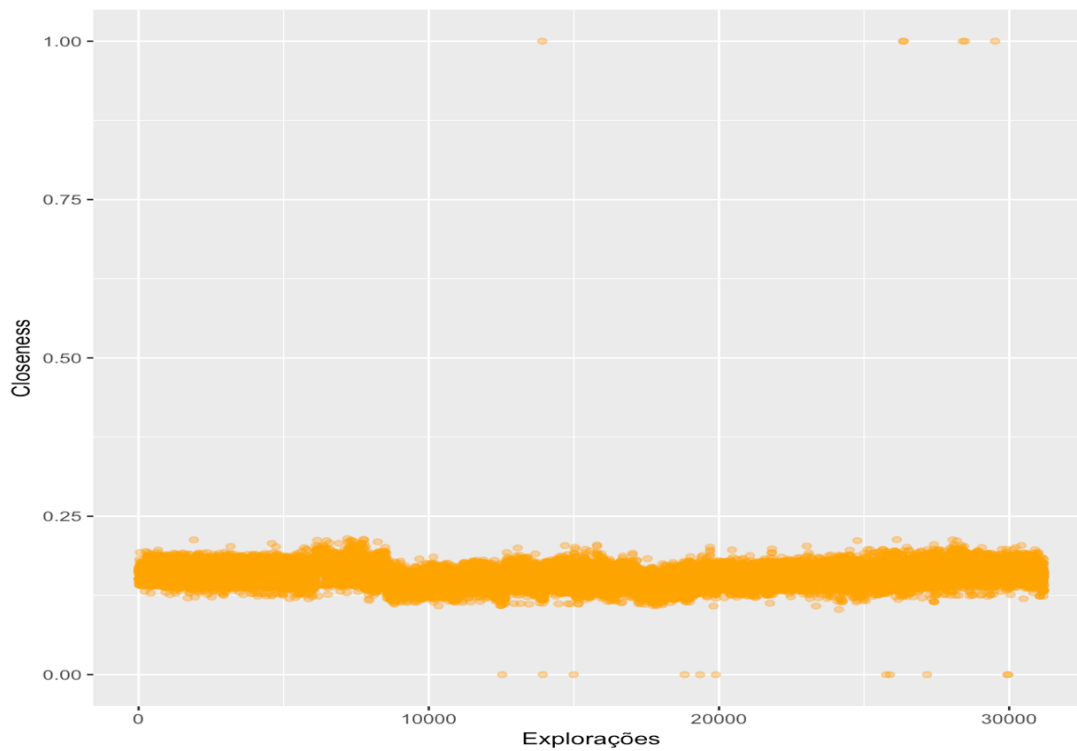


Gráfico 10: Distribuição do valor de *closeness* (proximidade) pelas explorações da rede, o valor de *closeness* ou proximidade varia entre 0 e 1.

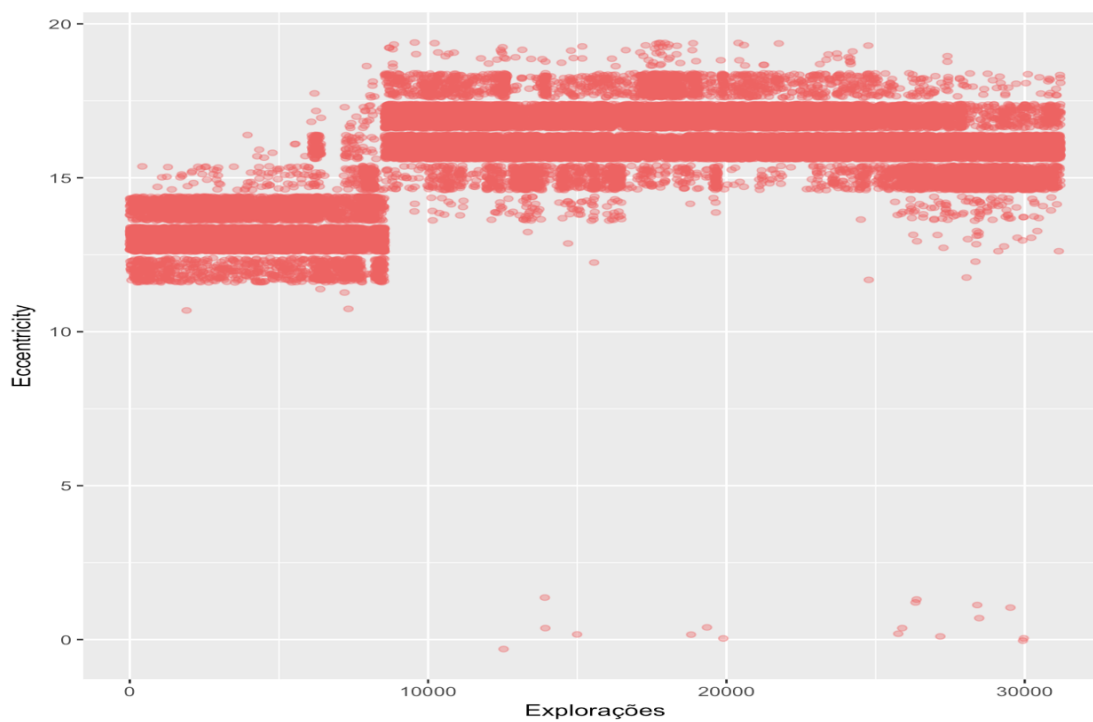


Gráfico 11: Distribuição do valor de *eccentricity* (excentricidade) pelas explorações da rede.

3.3.2.4 Pagerank

O valor de *Pagerank* médio na rede é de $3.211e-05$, ou seja, num universo de 31102 explorações, o valor de importância associado deste algoritmo é diminuto. No entanto, é possível verificar no gráfico 12 a existência de diversos *outliers*, que sobressaem da restante rede, o que por outras palavras, reflete que algumas explorações exibam uma maior relevância relativamente à maioria dos elementos da rede.

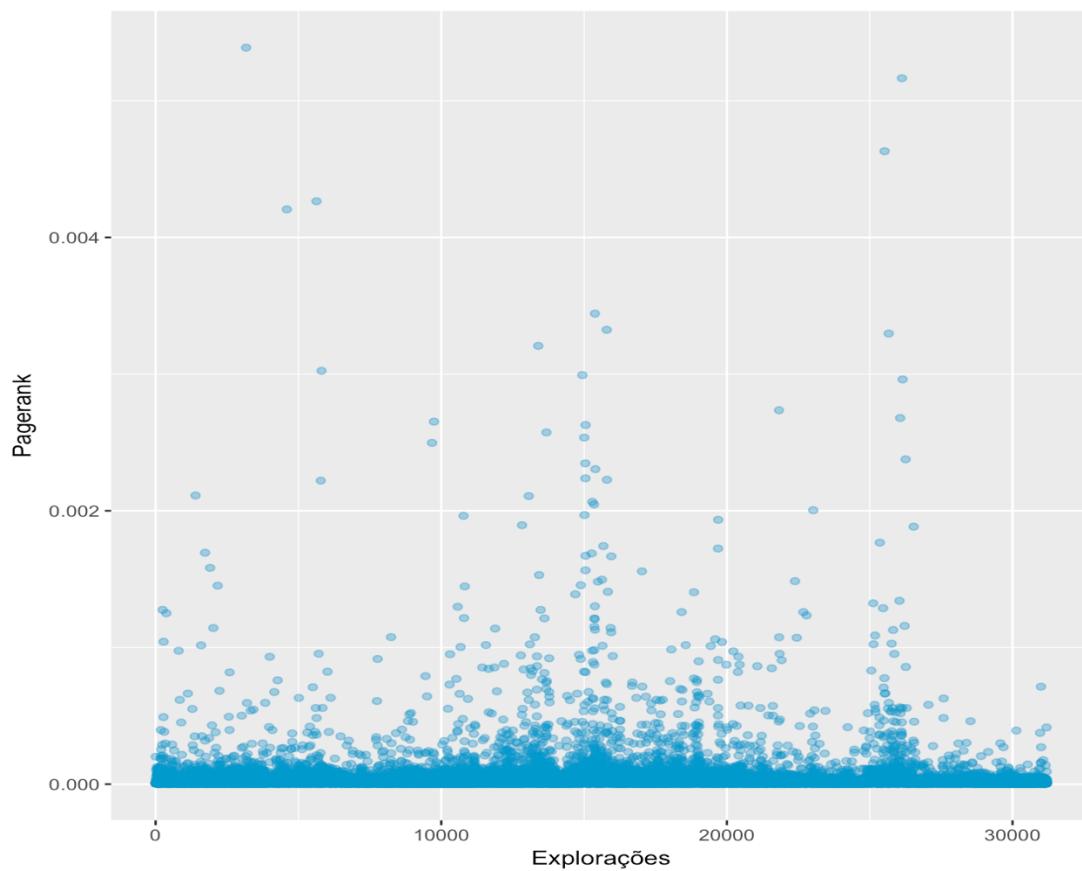


Gráfico 12: Distribuição do valor de *pagerank* pelas explorações da rede, o valor de Pagerank ou de importância varia entre 0 e 1.

3.3.3 Resumo dos indicadores de centralidade

Foram realizadas estatísticas descritivas aos indicadores de centralidade (tabela 4), o que permitiu visualizar a posição e dispersão dos indicadores na rede de movimentos de bovinos e no conjunto de explorações com focos de tuberculose bovina. Observou-se também os valores para uma significância de 0,05 através do teste não paramétrico *Wilcoxon* entre as médias dos indicadores de centralidade.

Indicadores de centralidade	Média	Mediana	Desvio Padrão	Min	3ªQ	Max	Valor de p ($\alpha=0,05$ <i>Wilcoxon</i>)
Graus de entrada Rede	4.5	1	19.6	0	3	878	<i>p</i><0,05
Graus de entrada Focos	40.1	3	174.4	0	11	1458	
Graus de saída Rede	4.5	2	7.4	0	5	330	<i>p</i> >0,05
Graus de saída Focos	9.5	3	19.9	0	9	145	
Coef. de aglomeração de entrada Rede	0.13	0.22	0.23	0	0.17	1	<i>p</i> >0,05
Coef. de aglomeração de entrada Focos	0.1	0.02	0.15	0	0.11	0.5	
Coef. de aglomeração de saída Rede	0.19	0.23	0.23	0	0.25	1	<i>p</i> >0,05
Coef. de aglomeração de saída Focos	0.14	0.11	0.14	0	0.16	0.5	

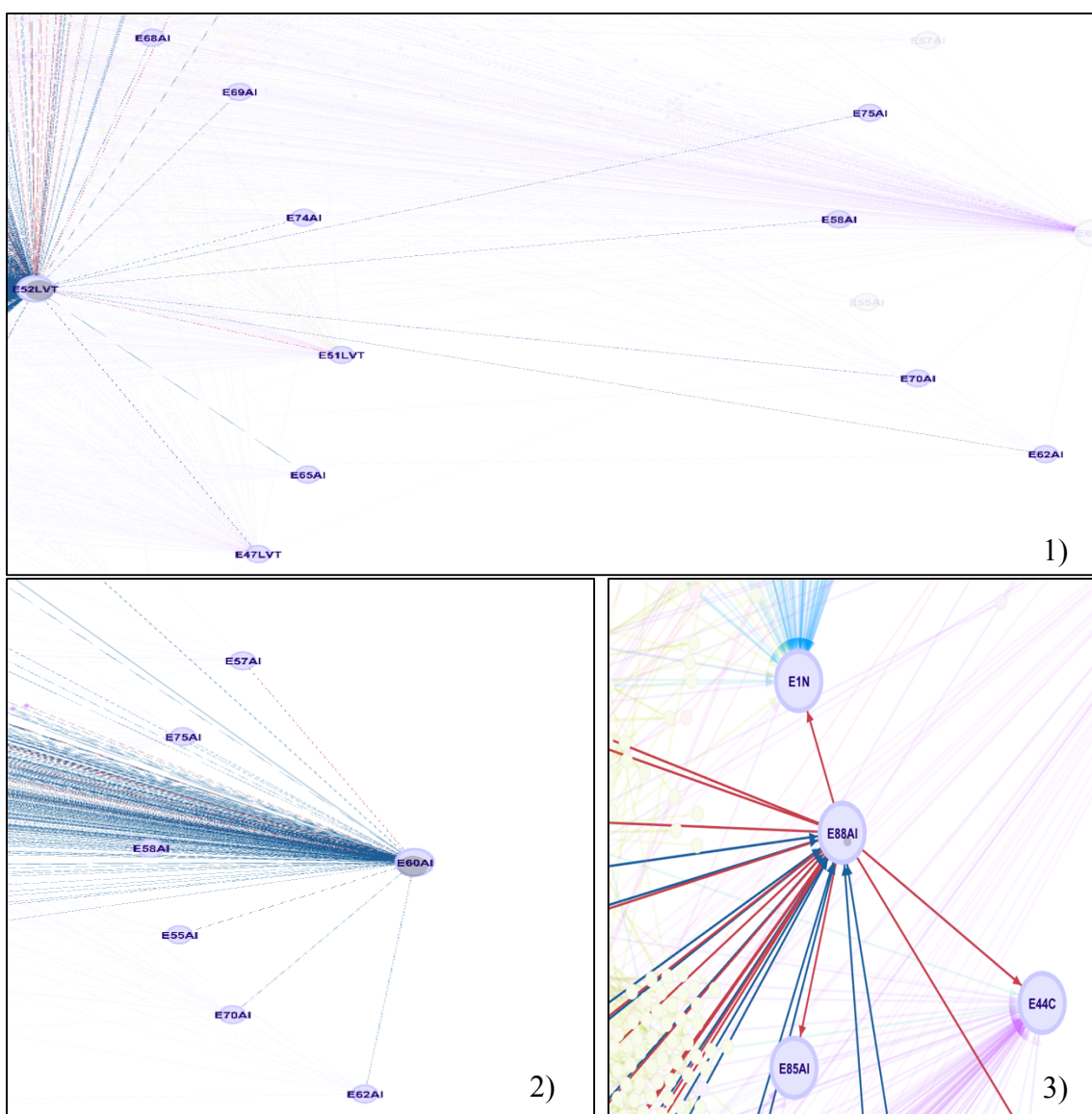
<i>Eccentricity</i> Rede	15.5	16	1.6	0	17	19	$p>0,05$
<i>Eccentricity</i> Focos	14	16	5.6	0	17	18	
<i>Closeness</i> Rede	0.16	0.15	0.02	0	0.16	1	$p>0,05$
<i>Closeness</i> Focos	0.15	0.16	0.11	0	0.17	1	
<i>Betweenness</i> Rede	86858	173	866524	0	18419	62160788	$p<0,05$
<i>Betweenness</i> Focos	1813409	5862	12765693	0	96941	109150300	
<i>Pagerank</i> Rede	3.2e-5	7 e-6	1.3e-4	5e -6	2.1e-5	5.3e-3	$p<0,05$
<i>Pagerank</i> Focos	2.2e-4	1.6e-5	6.6e-4	5e-6	7.7e-5	5.1e-3	

Tabela 4: Estatística descritiva aplicada aos indicadores de centralidade dos focos de bTB (n=73) e da rede de movimentos (n=31201) e valor de significância a partir do teste de *Wilcoxon*.

Na análise da estatística descritiva dos indicadores de centralidade existem diferenças notórias na maioria dos indicadores, para se perceber melhor essa diferença foi realizado o teste de *Wilcoxon*, comparando as médias dos indicadores em dois grupos: o primeiro representado pelas explorações com focos de tuberculose bovina, e o segundo representado pelos restantes elementos da rede. É possível verificar nos valores obtidos que, existem diferenças significativas entre as médias dos indicadores “Graus de entrada”, “*Betweenness*” e “*Pagerank*”.

3.3.4 Casos relevantes de ligações diretas entre explorações com focos de bTB.

A rede de movimentos apresenta casos interessantes de ligações entre explorações com focos de tuberculose bovina, ao todo, foi possível identificar sete conjuntos de ligações diretas entre as explorações selecionadas para o estudo. Destes sete conjuntos, os primeiros cinco conjuntos (figura 14.1-14.5) apresentam padrões de *spoligotyping* variados e os dois últimos apresentam resultados de *spoligotyping* semelhantes que serão estudados mais detalhadamente à frente.



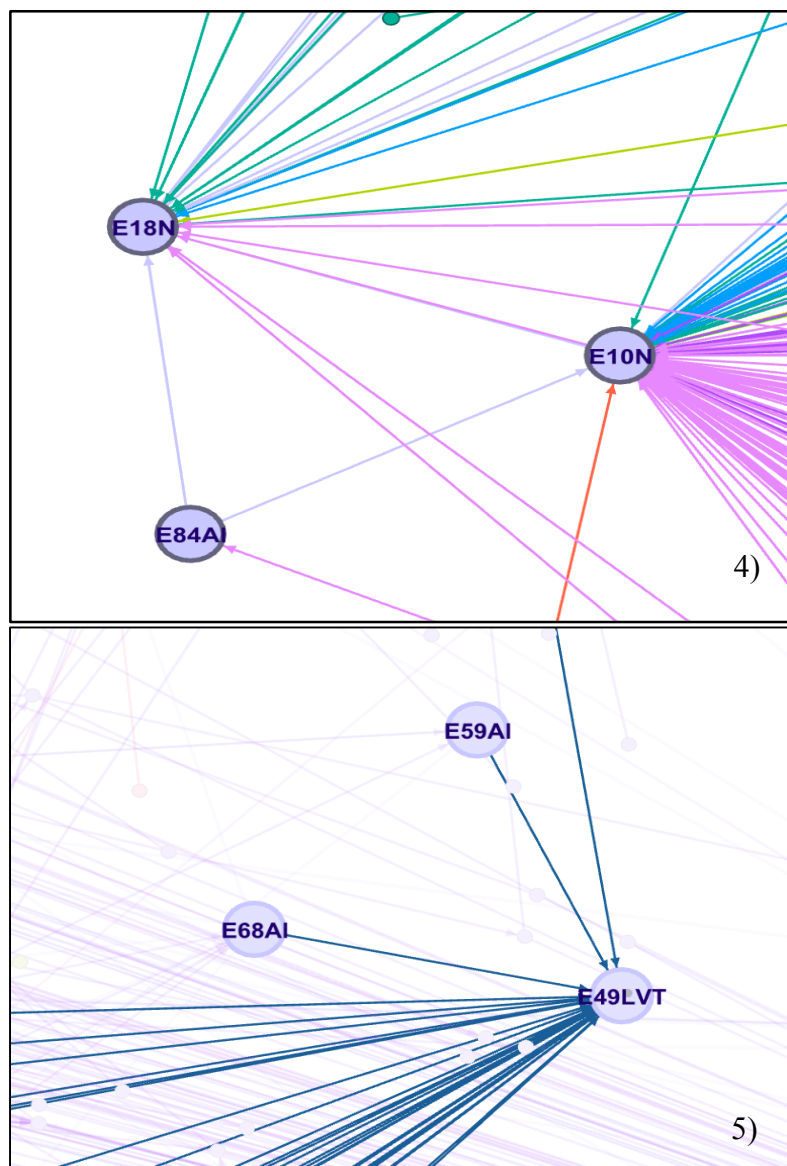


Figura 14.1,14.2, 14.3, 14.4 e 14.5: Representação das ligações diretas entre explorações com focos de tuberculose bovina. As explorações estão codificadas por um número de identificação atribuído para o estudo e a região onde se insere. (N-Norte; C-Centro; LVT-Lisboa e Vale do Tejo; AL-Alentejo). As setas simbolizam a direção do movimento.

3.3.4.1 Estudo de caso 1- *Spoligotypings* semelhantes

A figura 16 exibe um cronograma de trocas comerciais efetuadas entre várias explorações maioritariamente da região Norte, no período de 3/05/2013 a 11/02/2014. Neste cronograma destacam-se as trocas comerciais diretas de três explorações positivas a tuberculose bovina E30C, E24N e E22N (figura 15) com resultado de *Spoligotyping* SB0124. A colheita de material para confirmação de positividade a tuberculose bovina foi realizada na exploração E30C no dia 23/5/2013, E24N no dia 19/11/2013 e E22N no dia 3/4/2014.

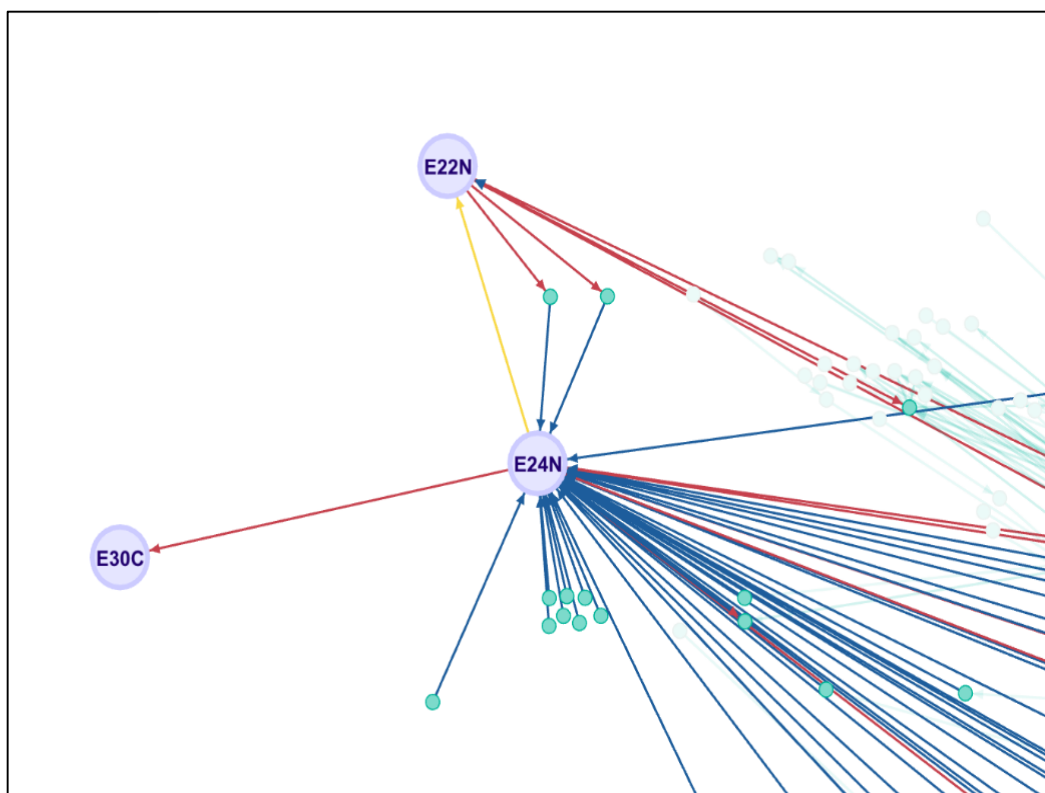


Figura 15: Representação gráfica da ligação entre explorações com focos de tuberculose bovina (cor lilás), designadamente, duas explorações da região Norte (E22N e E24N) e uma exploração da região Centro (E30C)

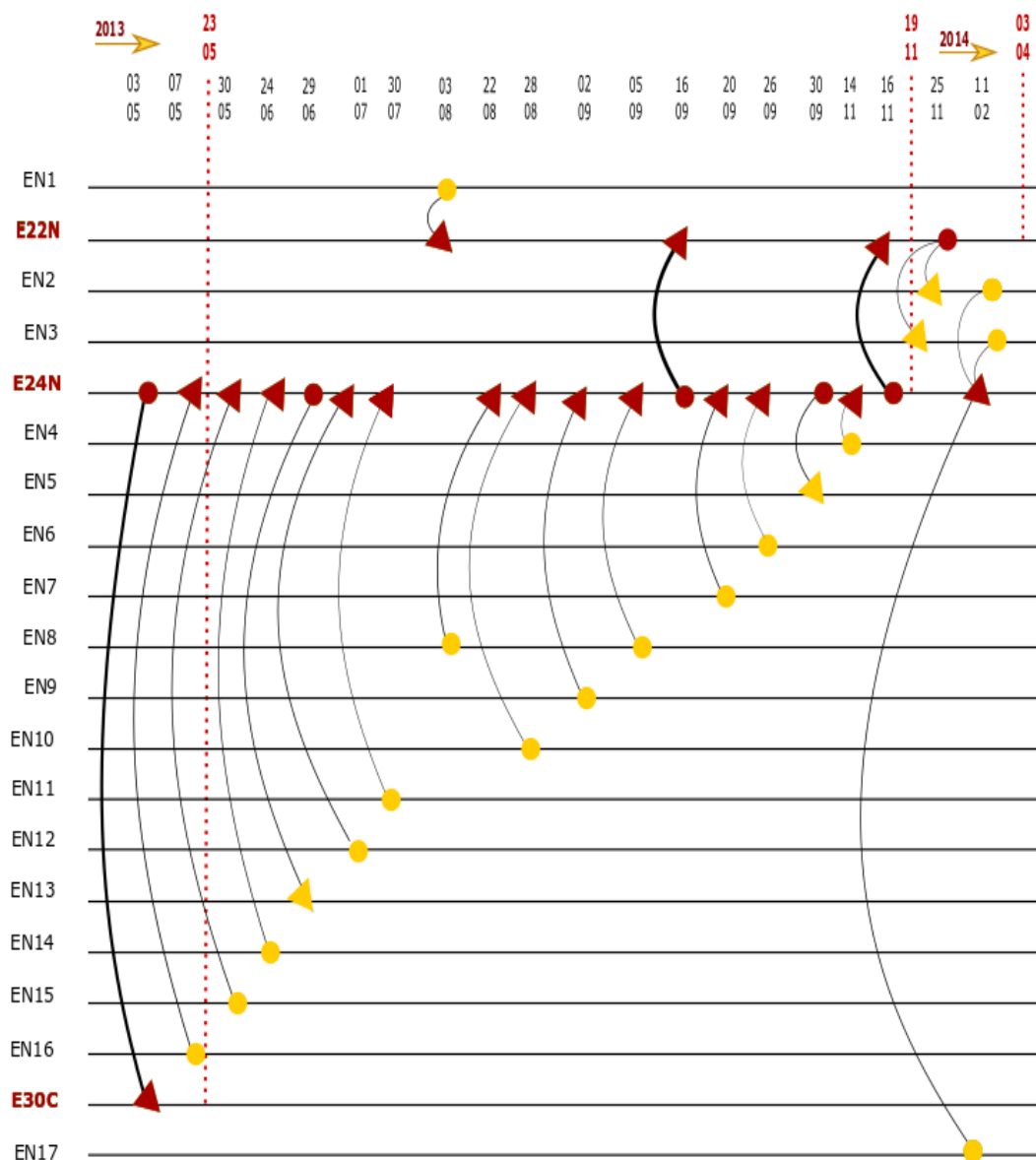


Figura 16: Cronograma dos movimentos de bovinos entre explorações, no espaço temporal de 3/05/2013 a 11/2/2014. A vermelho estão indicadas as explorações com focos de tuberculose bovina. As setas indicam o sentido do movimento. As linhas a tracejado de cor vermelha, indicam as datas em que foram realizadas as colheitas de material dos animais das explorações positivas a bTb para o LNIV.

3.3.4.2 Estudo de caso 2 - *Spoligotypings* semelhantes

A figura 18 exibe um cronograma de trocas comerciais efetuadas entre explorações das regiões do Alentejo, Centro e, Lisboa e Vale do Tejo, no período de 4/10/2013 a 19/03/2014. Neste cronograma destacam-se as trocas comerciais diretas entre três explorações positivas a tuberculose bovina E45C, E67AL e E72AL (figura 17) com resultado de *spoligotyping* SB0119. Os testes de tuberculina foram realizados na exploração E45C no dia 13/1/2014, E72AL no dia 13/3/2014 e E67AL no dia 23/3/2014.

A exploração E50LVT não foi incluída no cronograma, por apresentar apenas um movimento para a exploração E67Al no dia 4/4/2013 e o resultado do *spoligotyping* realizado a partir da colheita de 26/12/2013 ser distinto do restante grupo (SB1174).

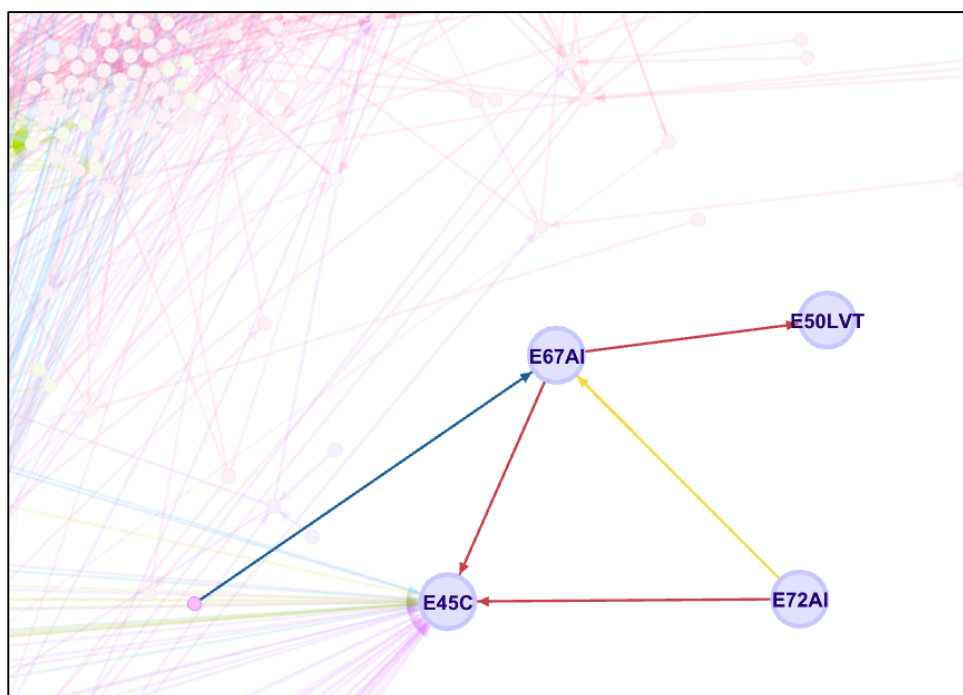


Figura 17: Representação gráfica da ligação entre explorações com focos de tuberculose bovina (cor lilás). A figura apresenta, uma exploração da região Centro (E45C) que recebe bovinos de duas explorações da região do Alentejo (E67AL e E72AL). A exploração da região de Lisboa e Vale do tejo (E50LVT) apenas tem ligação direta com a E67AL.

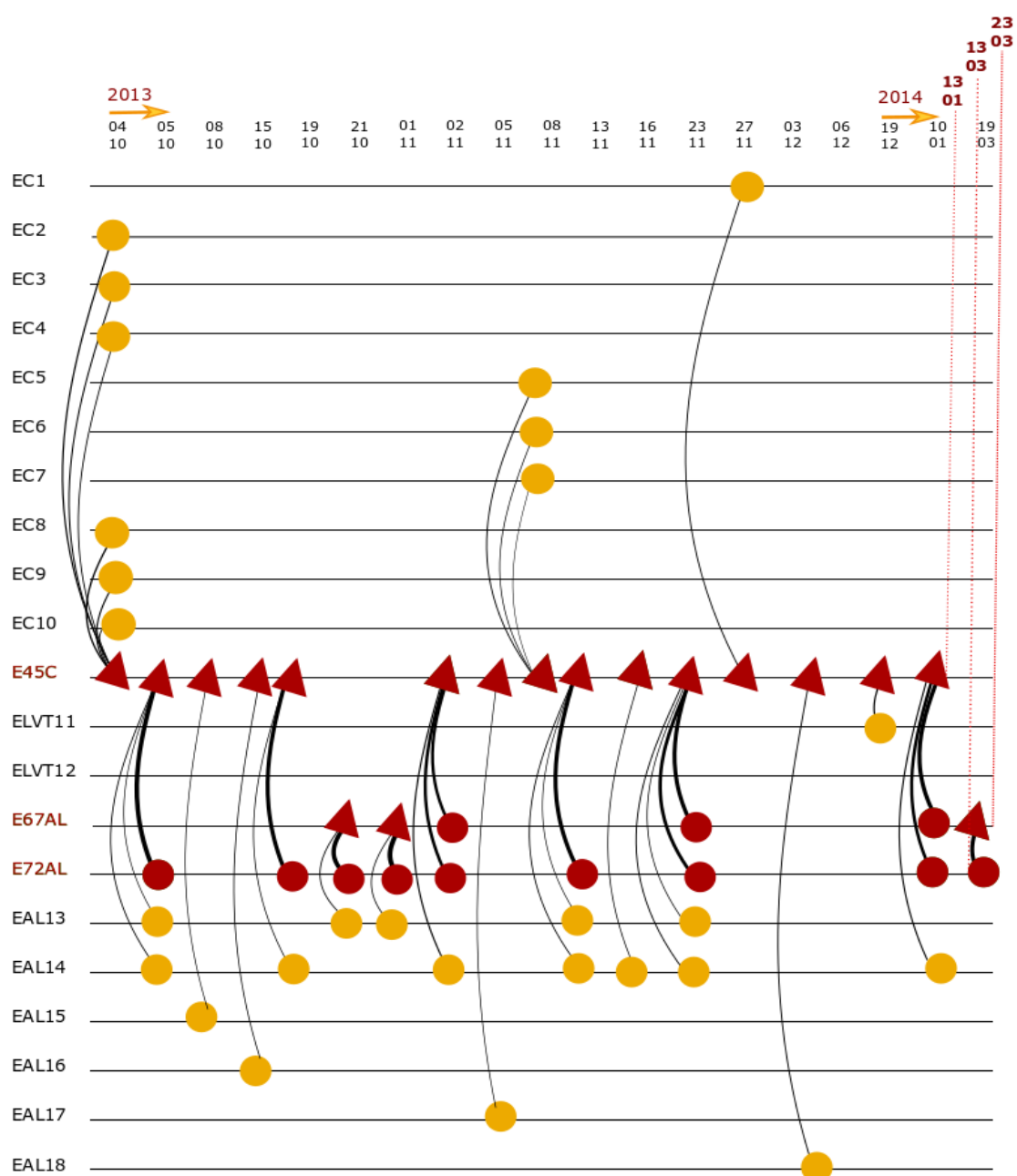


Figura 18: Cronograma dos movimentos de bovinos entre explorações da região do Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo, no espaço temporal de 4/10/2013 a 19/3/2014. A vermelho estão indicadas as explorações com focos de tuberculose bovina. As setas indicam o sentido do movimento. As linhas a tracejado de cor vermelha, indicam as datas em que foram realizadas as colheitas de material dos animais das explorações positivas a bTb para o LNIV.

3.4 Matriz de Proximidade

Obteve-se uma matriz de proximidade (gráfico 13), que relaciona a proximidade das trocas comerciais entre explorações com focos bTB, num total de 73 explorações. Verifica-se uma média entre explorações de 4,8 graus de distância e uma moda de 4 graus de distância.

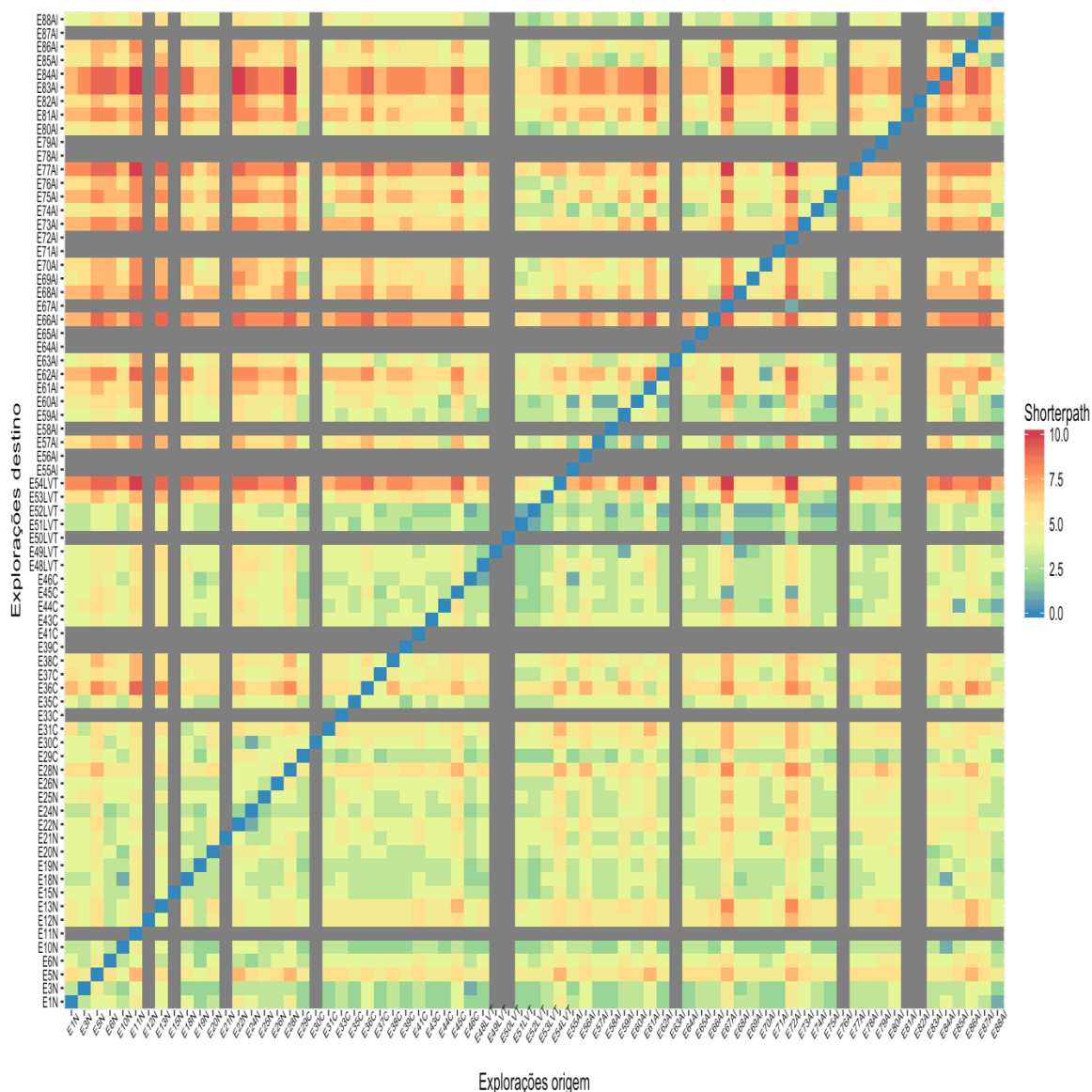


Gráfico 13: *Heatmap* da proximidade comercial entre explorações com focos de tuberculose bovina (n=73) tendo em conta a direção dos movimentos. A escala varia de 0 a 10. Sendo 0, o mais próximo possível e, 10 o mais distante. A cor cinza é referente a ausência de ligação entre explorações.

3.5 Análise dos padrões de *spoligotyping* mais frequentes em explorações

Na análise dos padrões mais frequentes de *spoligotyping* em explorações, no qual se incluem o SB0119, o SB1095, o SB1174 e o SB0122, observou-se a média da proximidade comercial e a média da distância euclidiana entre os focos que possuem o mesmo *spoligotyping* e focos com diferente *spoligotyping*, como representado na tabela 5.

<i>Spoligotyping</i>	\bar{X} de prox. comercial entre focos com = Sp	\bar{X} de prox. comercial entre focos com \neq Sp	Valor de p ($\alpha=0,05$ teste t)	\bar{X} de dist. euclidiana entre focos com = Sp	\bar{X} de dist. euclidiana entre focos com \neq Sp	Valor de p ($\alpha=0,05$ teste t)
SB0119	3,2	5	p< 0,05	91,9	135,5	p< 0,05
SB1095	4,6	5,1	p< 0,05	175,3	175,6	p> 0,05
SB1174	4,3	4,7	p> 0,05	80,8	132,7	p< 0,05
SB0122	3,6	4,3	p< 0,05	141,1	182,1	p< 0,05

Tabela 5: Análise dos padrões de *spoligotyping* mais frequentes em explorações. Comparação das médias de proximidade de trocas comerciais e da distância euclidiana, de explorações com o mesmo *spoligotyping*, e da relação das explorações com os *spoligotypings* representados com as restantes explorações de *spoligotyping* diferente.

3.6 Avaliação da relação entre indicadores

3.6.1 Zonas de caça

Para a análise estatística das zonas de caça foi utilizado correlação de *Spearman* que permitiu observar a correlação que existe entre as distancia euclidiana e a proximidade genética através do índice de Jaccard (gráfico 14)

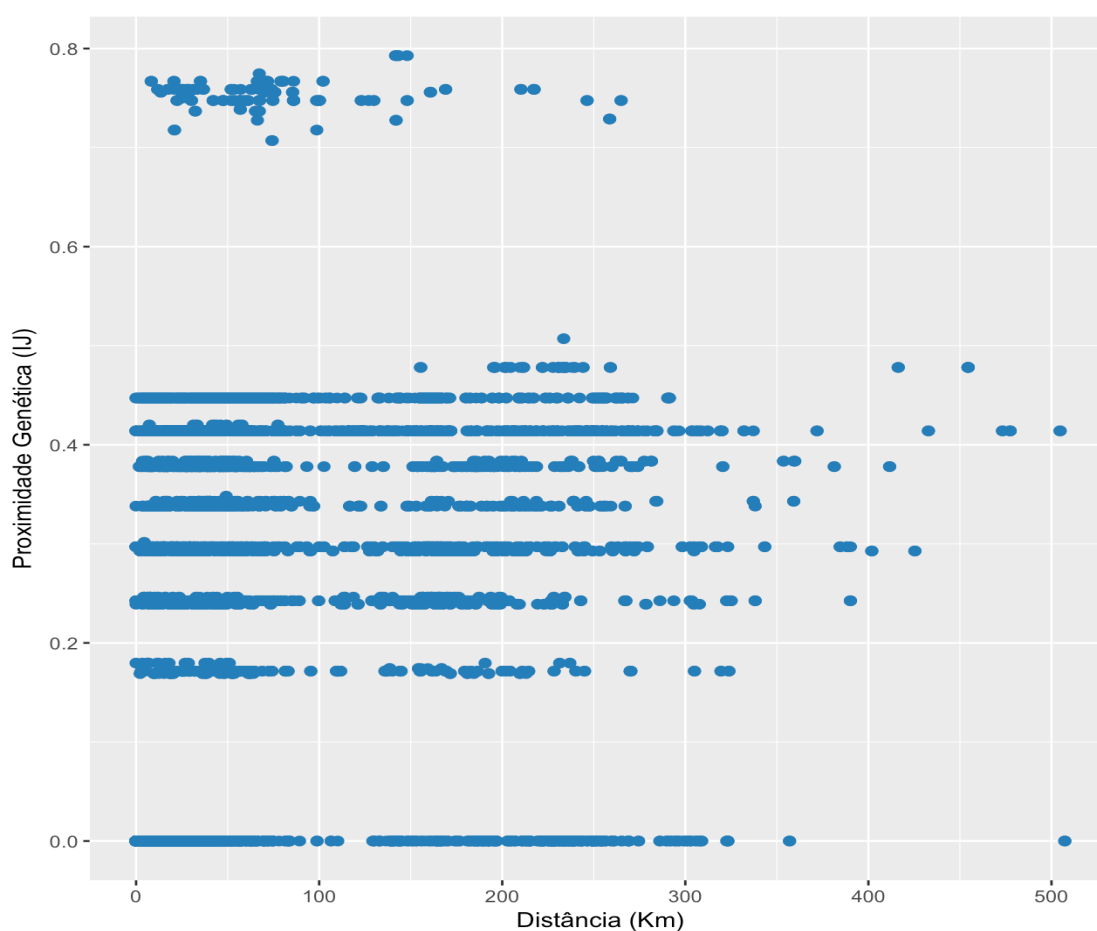


Gráfico 14: Correlação de *Spearman* entre a distância euclidiana (km) com a proximidade genética das zonas de caça com focos de tuberculose (n=66).

3.6.2 Explorações

Para avaliação da relação entre os indicadores das explorações foi utilizado uma correlação de *Spearman*, que permitiu observar a relação que existe entre a proximidade genética dos padrões de *spoligotyping*, a distância euclidiana e a proximidade das trocas comerciais entre explorações (gráfico 15)

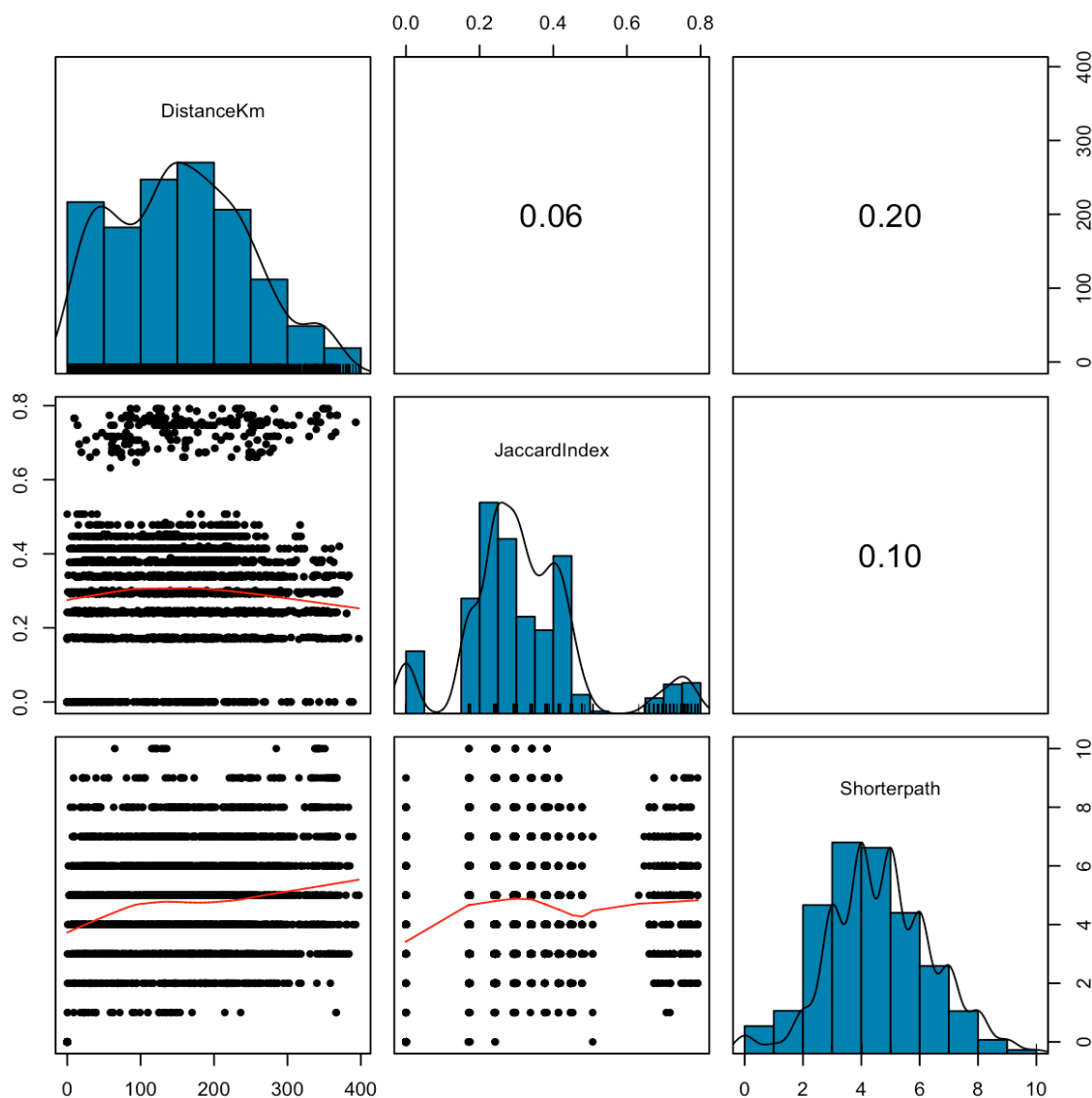


Gráfico 15: Representação gráfica da correlação *Spearman* entre a proximidade genética, distância euclidiana e a proximidade das trocas comerciais entre explorações (n=73).

4 Discussão

4.1 Spoligotyping

Foram analisados por *spoligotyping*, 206 isolados positivos a *Mycobacterium bovis*, pertencentes a 113 bovinos e 93 silváticos, referentes a 53 javalis e 40 veados, no espaço temporal alusivo aos anos 2013 e 2014. No resultado obteve-se 35 spoligotipos diferentes, sendo o padrão predominante o SB1174 seguido do SB0122 e SB1264. Por espécie, nos bovinos o padrão mais frequente foi SB1095, assim como parece ser exclusivo da espécie. Nos silváticos, tanto nos javalis como nos veados o padrão predominante foi o SB1174. Segundo estudos anteriores realizados por Duarte *et al.*, 2008 e Cunha *et al.*, 2012 durante o período de 2002-2009 o padrão mais comum em Portugal foi o SB0121, distinto dos resultados obtidos no estudo. Todavia os três padrões mais frequentes no estudo, integram os padrões mais frequentes até à data estudados em Portugal.

Num estudo mais recente, realizado por García-Jiménez *et al.*, 2016, que estudou os padrões de *spoligotyping* durante os anos 2008-2012 na Extremadura, o padrão mais frequente, corrobora as autoras dos estudos em Portugal, no entanto, apresenta os padrões SB0122 e SB1174 como o segundo e terceiro mais frequente na zona da Extremadura. Especifica ainda que, onde ocorre maior aglomeração do padrão SB1174 é na zona abaixo do rio Tejo e contigua a Portugal, que vai de encontro aos resultados do estudo, onde as zonas onde este padrão se encontra mais presente, são as zonas de Nisa e Castelo de Vide do distrito de Portalegre.

Outro fator que reforça este resultado é o facto das zonas do distrito de Castelo Branco e do distrito de Portalegre representarem mais de metade dos focos de bTB do estudo, composto 77% do total das zonas de caça 31% do total das explorações.

4.2 Proximidade genética

Na proximidade genética entre os padrões de *spoligotyping*, destacam-se alguns casos interessantes de observar, referente a zonas de Portugal (figura 11) onde os padrões com maior proximidade genética se encontram aglomerados. Nomeadamente na zona norte, distrito de Vila Real, onde foi possível verificar a predominância de padrões SB1095, SB0124, SB1264 e SB1190, pertencentes ao cluster vermelho do dendrograma do gráfico 3, mais especificamente nos concelhos de Vila Real, Mondim de Bastos e Ribeira da Pena.

No distrito de Castelo Branco e Portalegre, principalmente na zona da arraia, há uma presença bastante vincada dos spoligotipos SB1174 e SB0122, a que são pertencentes a cluster roxo e vermelho respetivamente.

No Alentejo distrito de Beja, concelho de Moura e Barrancos há predominância do padrão SB1190 com apenas a ocorrência de um foco com o padrão SB0265, com o qual existe uma grande proximidade genética.

4.3 Georreferenciação

No processo de georreferenciação dos focos de tuberculose bovina, foi possível verificar que em todos os distritos de Portugal continental houve ocorrência de focos de tuberculose bovina. Contudo como já mencionado anteriormente existem zonas com maior aglomeração de focos. Na zona norte predomina os focos de bTB em explorações. Já nas zonas do distrito de Castelo Branco e Portalegre, apresentam mais de metade dos focos de bTB estudados composto por 77% do total das zonas de caça do estudo.

Nos *heatmaps* de distâncias euclidianas (gráfico 4 e 5) é possível observar que as zonas de caça têm uma distância consideravelmente menor comparativamente às explorações. Esse facto é devido em grande parte, à aglomeração de zonas de caça com focos de bTB no distrito de Castelo Branco e Portalegre. As explorações têm uma distribuição muito mais homogénea e, portanto, distâncias muito maiores entre elas.

4.4 Rede de movimentos

4.4.1 Indicadores de Centralidade

Na rede movimentos onde estão representadas as trocas comerciais de bovinos realizados entre 31201 explorações, foi possível observar com base na interação entre as explorações a presença de 10 comunidades. Naturalmente verificou-se que estas comunidades estão relacionadas com a localização em que as explorações se encontram, dado que tente a ocorrer mais trocas comerciais com vizinhos próximos.

Através dos indicadores de centralidade foi possível traçar o comportamento global da rede de movimentos de bovinos. Foi possível constatar através dos medidores de distância que a rede, apresenta uma grande dimensão e, que está heterogeneamente interligada. Os valores de *closeness* (proximidade) baixo, e um valor elevado de *betweenness* (intermediação), indicam um numero elevado de intervenientes na rede, assim como um *eccentricity* (excentricidade) elevado, que também valida não só a quantidade intervenientes, mas também as ligações díspares da rede.

É também relevante, a enorme discrepância entre os valores individuais dos indicadores de centralidade das explorações o que corrobora a heterogeneidade entre os elementos da rede. Um exemplo interessante desse facto é a exploração E52LVT, referenciada por apresentar um foco de tuberculose bovina. Esta exploração na rede, é a que apresenta mais graus de entrada, obteve durante o período de 2012 a 2014, uns extraordinários 1458 graus de entrada. Uma exploração apresentar um *betweenness* elevado, demonstra um forte impacto sobre a rede de movimentação de animais. Novamente a exploração E52LVT, apresenta um elevado número de ligações a outras explorações, como também maior *betweenness* correspondente ao maior *outlier* do gráfico 9. Consequentemente uma maior ascendência sobre a rede como é também demonstrado pelo algoritmo de influência *pagerank*.

4.4.2 Comparação dos indicadores de centralidade da rede e dos focos bTB

Nos indicadores de centralidade realizou-se a estatística descritiva, de dois grupos, nomeadamente de 73 explorações com focos de bTB e dos restantes integrantes da rede (tabela 4). Inferiu-se através do teste de *Wilcoxon*, se existe significância estatística entre as médias dos indicadores, obteve-se os seguintes resultados:

No indicador de centralidade “grau de entrada” conclui-se que explorações com uma maior ressecção de animais proveniente de várias explorações apresentam maior possibilidade de entrada da doença no seu efetivo, facto corroborado pelo estudo realizado por (Palisson *et al.*, 2016).

Quanto aos medidores de distância, o *betweenness* é francamente superior à média da rede, pois explorações com mais ligações, intervêm mais vezes como ponte de intermediação na rede. O *pagerank* também apresentou significância estatística, o que permite concluir que as explorações com focos de tuberculose bovina apresentam maior influência na rede do que a média da rede.

Estes resultados sugerem que explorações que apresentaram casos de tuberculose bovina no seu efetivo tendem a ter maior importância e um comportamento mais ativo na comunidade, acarretando por uma maior possibilidade de importação de doenças infecciosas.

4.4.3 Proximidade entre explorações com focos de bTB

Na análise da rede de movimentos de bovinos por trocas comerciais entre explorações, foi possível compreender, que num universo de mais de 31 mil explorações foram identificadas numerosas ligações diretas entre as 73 explorações com focos de bTB.

No total constatou-se a presença de sete conjuntos de ligações diretas entre explorações. Cinco conjuntos foram identificados com padrões de *spoligotyping* díspares, provavelmente derivado de vias de transmissão de curto alcance como: o contacto de animais de explorações contíguas, a transmissão por animais silváticos ou mesmo um histórico de bTB na exploração, ou, outra possibilidade a ter presente, é a via de transmissão de longo alcance através de trocas comerciais realizadas anteriormente.

Existem também dois conjuntos que apresentam os mesmos padrões de *spoligotyping* entre as ligações diretas das explorações com bTB.

No primeiro estudo de caso, correspondente à figura 15, verificam-se ligações entre as explorações com focos de bTB, E30C, E24N e E22N, em que todas revelaram na análise de *spoligotyping* o padrão SB0124. Visualizando o cronograma da figura 16, e tendo em conta as datas das colheitas do material para análise, é sugestivo, que a exploração E24N seja a exploração que potenciou, a ocorrência dos outros focos de bTB nas explorações E30C e E22N.

No segundo estudo de caso, correspondente à figura 17, observa-se as ligações entre as explorações com focos de bTB, E45C, E67AL e E72AL com um padrão comum de *spoligotyping* SB0119. É perceptível no cronograma da figura 18, que a exploração E45C recebe de várias explorações com várias localizações geográficas, o que sugere ser uma exploração de destino de bovinos. Todavia a exploração E72AL têm ligação de origem com a E45C e E67AL pelo que aparenta ser, a exploração que potenciou a ocorrência de focos de bTB nas outras duas explorações.

No *heatmap* da proximidade de ligações comerciais entre explorações com bTB (gráfico 13) que tem em conta a direção das ligações comerciais, é possível observar que as explorações que se localizam no Norte e Centro do país, detêm maior proximidade com a maioria das explorações comparativamente às explorações do Alentejo. Na matriz de proximidade de ligações comerciais entre explorações com focos de bTB, é perceptível que este conjunto de 73 explorações, está consideravelmente próximo entre si, pois em média, apenas é necessário percorrer cerca de 5 explorações, para se interligarem entre si, tendo em conta que a movimentação é direcionada.

4.5 Análise dos padrões de *spoligotyping* mais frequentes em explorações

Na análise de padrões de *spoligotypings* mais frequentes em explorações (tabela 5), foram observados o comportamento de quatro padrões: SB0119, SB1095, SB1174, SB0122. Destes padrões, comparou-se as médias da distância euclidiana e da distância comercial

entre explorações com o mesmo *spoligotyping* e a relação entre os padrões de *spoligotyping*s representados com as restantes explorações de *spoligotyping* diferente. Foi possível observar nos padrões mais frequentes em estudo, que tanto a média da distância euclidiana como a média de distância comercial são menores em explorações com o mesmo *spoligotyping* comparativamente com as de *spoligotyping* diferente. Foi estatisticamente significativo a diferença entre médias de proximidade comercial de explorações com o mesmo *spoligotyping* e explorações que apresentam diferentes *spoligotyping*s nos padrões SB0119, SB1095 e SB1022. Na distância euclidiana existe diferença estatística entre as médias dos padrões SB0119, SB1174 e SB0122.”

De todos os padrões o que maior apresenta uma discrepância de valores observada é padrão SB0119 comparativamente às explorações de *spoligotyping* diferente.

4.6 Avaliação da relação entre indicadores

Na análise estatística foi realizada dois testes, na primeira utilizou-se correlação de *Spearman*, no qual relaciona a proximidade genética (índice de Jaccard) e a distância euclidiana entre zonas caça com focos de bTB (gráfico 14). Podemos observar uma grande dispersão dos valores da proximidade genética, em quase todas as distâncias entre zonas de caça, o que revela que os animais apresentam uma grande variabilidade de padrões de *spoligotyping*, tendo em conta que não existe controlo na movimentação dos animais silváticos nem se estima a quantidade javalis e veados presentes em Portugal. Todavia é perceptível que os valores exibidos da proximidade genética são maioritariamente próximos variando entre 0 e 0,5.

Na análise estatística realizada às explorações com focos de bTB utilizou-se também uma correlação de *Spearman*, que relaciona proximidade genética, a distância euclidiana e a proximidade comercial das explorações com foco de bTB.

Nos resultados do gráfico 15, apesar das correlações não serem muito significativas, é possível observar uma maior correlação entre a distância euclidiana e a proximidade comercial, o motivo é explicado pelo facto de vizinhos próximos terem maior propensão a realizarem trocas comerciais entre si. Não existe uma correlação significativa nos restantes indicadores, o que revela que é necessário testar novos indicadores de maneira a explicarem melhor o modelo.

5 Conclusão

Neste trabalho experimental utilizou-se abordagens inovadoras no estudo da problemática da tuberculose bovina em Portugal, tendo como objetivo, criar novos horizontes e ferramentas que auxiliem no futuro, um controlo mais eficiente da doença.

No decorrer do estudo, foi possível analisar os padrões de *spoligotyping* mais comuns em Portugal nos anos 2013 e 2014, tanto em silváticos como em bovinos, e, determinou-se a distância genética entre padrões de *spoligotyping* através do índice de Jaccard.

Obteve-se a geolocalização dos focos de tuberculose bovina, e determinou-se a distância euclidiana entre eles.

Através dos registos de movimentos de bovinos, construiu-se uma rede de movimentos e avaliou-se, em primeira mão a dinâmica das trocas comerciais entre explorações de bovinos em Portugal. Foi possível concluir na análise efetuada aos indicadores de centralidade da rede que, explorações que apresentam uma maior influência na rede, uma maior intermediação e uma maior ressecção de animais de diferentes explorações, apresentam por sua vez uma maior possibilidade de ocorrência de infeções de tuberculose bovina. Este fenómeno é visível, através do estudo de casos de explorações com ligações diretas e mesmo *spoligotyping*, o que levanta questões de ordem técnica, nomeadamente, a sensibilidade das tuberculinas aplicadas, ou a realização do procedimento, uma vez que o programa de controlo e erradicação de tuberculose bovina implementado em Portugal contempla a testagem por IDTC em testes rotina ao efetivo, testes de pré-movimentação e no embargo comercial de bovinos em caso de suspeita ou positividade de bTB numa exploração.

Na observação de padrões de *spoligotyping* mais frequentes em bovinos em que se comparou a média da distância euclidiana e a média distância comercial entre explorações com o mesmo padrão de *spoligotyping* e a relação dos padrões apresentados com explorações com *spoligotyping* diferente, foi possível observar uma diferença de médias. Foi perceptível que as explorações com *spoligotyping* igual tendem a apresentar uma menor distância euclidiana e também menor distância comercial, o que sugere que a transmissão de tuberculose bovina tenderá a ter relação com a proximidade entre explorações de bovinos.

Na avaliação da relação entre indicadores das zonas de caça, onde se relacionou distância euclidiana e proximidade genética não houve uma correlação significativa, o que leva a crer que existe uma grande dispersão de padrões de *spoligotyping* nos silváticos, ainda assim difícil de avaliar, por não haver controlo dos movimentos dos silváticos nem se estimar quantos veados e javalis estão presentes em Portugal.

Nas explorações onde se relacionou proximidade genética, distância euclidiana e a proximidade comercial, não houve uma correlação que explicasse devidamente o modelo. Contudo, em estudos futuros será interessante relacionar outros indicadores, como a inclusão de inquéritos epidemiológicos de forma a obter-se uma abordagem mais específica das explorações, assim como, outros indicadores específicos na rede de movimentos como, a quantidade de bovinos transacionados (peso das ligações) entre explorações, a utilização de uma rede de movimentos dinâmica tendo em conta as datas dos movimentos de bovinos. Outros indicadores que poderão diferenciar mais os resultados são relativos à análise molecular, com a utilização de testes com um índice discriminatório superior de maneira a diferenciar com mais detalhe as estirpes de *Mycobacterium bovis*. Este trabalho poderá ser o princípio de uma ferramenta interessante para uma análise de doenças infecciosas, de forma a obter-se uma informação rápida e eficiente em surtos das mesmas.

Bibliografia

- Aboubaker Osman, D., Garnotel, E., & Drancourt, M. (2017). *Dry-heat inactivation of "Mycobacterium canettii"*. *BMC Research Notes*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2522-z>
- Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., & Gey van Pittius, N. C. (2010). *Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, M. mung*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8), pp.1296–1299.
<https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
- Alexander, K. A., Pleydell, E., Williams, M. C., Lane, E. P., Nyange, J. F. C., & Michel, A. L. (2002). *Mycobacterium tuberculosis: An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife: Emerging Infectious Diseases*, 8(6), pp. 598–601.
<https://doi.org/10.3201/eid0806.010358>
- Amato, B., Di Marco Lo Presti, V., Gerace, E., Capucchio, M. T., Vitale, M., Zanghì, P., ... Boniotti, M. B. (2018). Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis complex strains isolated from livestock and wild animals in Italy suggests the need for a different eradication strategy for bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), pp.416–424.<https://doi.org/10.1111/tbed.12776>
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., & Domínguez, L. (2003). Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), pp.1785–1789. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02532>
- Bigras-Poulin, M., Thompson, R. A., Chriel, M., Mortensen, S., & Greiner, M. (2006). *Network analysis of Danish cattle industry trade patterns as an evaluation of risk potential for disease spread. Preventive Veterinary Medicine*, 76(1–2), pp.11–39.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.04.004>

- Boardman, W. S. J., Shephard, L., Bastian, I., Globan, M., Fyfe, J. A. M., Cousins, D. V., ... Woolford, L. (2014). *Mycobacterium Pinnipedii* Tuberculosis in a free-ranging Australian fur seal (*Arctocephallus Pusillus Doriferus*) in South Australia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(4), pp. 970–972.
<https://doi.org/10.1638/2014-0054.1>
- Boniotti, M. B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., ... Paciarini, M. L. (2014). Detection and Molecular Characterization of *Mycobacterium microti* Isolates in Wild Boar from Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), pp.834–2843. <https://doi.org/10.1128/JCM.00440-14>
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), pp.3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
- Carter, Gordon R.; WISE, Darla J. *Mycobacterium* in Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6. ed ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2004, pp. 207-212 ISBN 978-0-8138-1179-6,
- Cavanagh, R., Begon, M., Bennett, M., Ergon, T., Graham, I. M., de Haas, P. E. W., ... Soolingen, D. v. (2002). *Mycobacterium microti* Infection (Vole Tuberculosis) in Wild Rodent Populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), pp.3281–3285. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3281-3285.2002>
- Cipullo, Rafael - Comparação e análise da rede de movimento de bovinos de propriedades positivas e negativas para brucelose no Estado de Mato Grosso. [S.l.] : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2013, pp. 12-29.

- Cipullo, R. I., Grisi-Filho, J. H. H., Dias, R. A., Ferreira, F., Ferreira Neto, J. S., Gonçalves, V. S. P., ... Amaku, M. (2016). Cattle movement network, herd size, and bovine brucellosis in the State of Mato Grosso, Brazil. *Semina. Ciências Agrárias*, 37(5Supl2), 3777. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3777>
- Clarke, C., Van Helden, P., Miller, M., & Parsons, S. (2016). Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African sub-region. In *Journal of the South African Veterinary Association*, 87(1) <https://doi.org/10.4102/jsava.v87i1.1322>
- Cowan, L. S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J. P., & Crawford, J. T. (2002). Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Isolates with Low Copy Numbers of IS6110 by Using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1592–1602. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1592-1602.2002>
- Amorim, D. B., Casagrande, R. A., Alievi, M. M., Wouters, F., De Oliveira, L. G. S., Driemeier, D., ... Ferreira-Neto, J. S. (2014). *Mycobacterium pinnipedii* in a Stranded South American Sea Lion (*Otaria byronia*) in Brazil. In *Journal of Wildlife Diseases*, 50(2), pp.419–422. <https://doi.org/10.7589/2013-05-124>
- DG SANTE. (2016). Relatório final de uma auditoria realizada em Portugal de 29 de Fevereiro de 2016 a 9 de Março de 2016 destinada a avaliar a execução dos programas de erradicação de Brucelose e Tuberculose bovina (No. DG(SANTE) 2016-8773-MR). Comissão Europeia.
- DGAV. (2005). Manual de procedimentos para a realização da prova de intradermotuberculinização de comparação (IDC).
- DGAV. (2011). Plano de Controlo e Erradicação de Tuberculose em Caça Maior.
- DGAV. (2017). Programa Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina.

- Dippenaar, A., Parsons, S. D. C., Sampson, S. L., van der Merwe, R. G., Drewe, J. A., Abdallah, A. M., ... Warren, R. M. (2015). Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae* Tuberculosis, *95*(6), 682–688.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.10.001>
- Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Veterinary Science*, *97*, S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>
- Duarte, E. (2008). *Tuberculose bovina: Detecção molecular e genotipagem de Mycobacterium bovis*, Universidade de Évora.
- El-Sayed, A., El-Shannat, S., Kamel, M., Castañeda-Vazquez, M. A., & Castañeda-Vazquez, H. (2016). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*, in Humans and Cattle. *Zoonoses and Public Health*, *63*(4), pp. 251–264.
<https://doi.org/10.1111/zph.12242>
- European Court of Auditors. (2016). *Programas de erradicação, controlo e vigilância destinados a limitar as doenças animais. Relatório especial no. 06, 2016. Relatório especial no. 06, 2016*. Luxembourg: Publications Office. Obtido de <http://bookshop.europa.eu/uri?target=EUB:NOTICE:QJAB16006:PT:HTML>
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, *15*(12).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- Ferreira, T. (2013). *Redes Sociais e Classificação Conceptual: Abordagem Complementar para um Sistema de Recomendação de Coautorias*. Universidade do Porto, FEP, pp. 25-40.

- Fitzgerald, S. D., & Kaneene, J. B. (2013). Wildlife Reservoirs of Bovine Tuberculosis Worldwide: Hosts, Pathology, Surveillance, and Control. *Veterinary Pathology*, 50(3), pp.488–499. <https://doi.org/10.1177/0300985812467472>
- Forbes, B. A. (2017). Mycobacterial Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), pp. 380–383. <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-16>
- García-Jiménez, W. L., Cortés, M., Benítez-Medina, J. M., Hurtado, I., Martínez, R., García-Sánchez, A., ... Hermoso-de-Mendoza, J. (2016). Spoligotype diversity and 5-year trends of bovine tuberculosis in Extremadura, southern Spain. In *Tropical Animal Health and Production*, 48(8), 1533–1540. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1124-4>
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., ... Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>
- Gong, M., Li, G., Wang, Z., Ma, L., & Tian, D. (2016). An efficient shortest path approach for social networks based on community structure. *CAAI Transactions on Intelligence Technology*, 1(1), pp.114–123. <https://doi.org/10.1016/j.trit.2016.03.011>
- Gordon, S. V., & Behr, M. A. (2015). Comparative mycobacteriology of the *Mycobacterium tuberculosis*/i complex. In H. Mukundan, M. A. Chambers, W. R. Waters, & M. H. Larsen (Eds.), *Tuberculosis, leprosy and mycobacterial diseases of man and animals: the many hosts of mycobacteria*, Wallingford: CABI pp. 17–29. <https://doi.org/10.1079/9781780643960.0017>
- Groenen, P. M. A., Bunschoten, A. E., Soolingen, D. van, & Erftbden, J. D. A. van. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method in *Molecular Microbiology*, 10(5), pp.1057–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., ... Vincent, V. (2005). Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. In *PLoS Pathogens*, 1(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005>
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., ... van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), pp. 907–914.
- Kazda, Jindrich (2009) The Chronology of Mycobacteria and the Development of Mycobacterial Ecology in Kazda, Jindrich - *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. 2. ed. [S.l.]: Springer Netherlands. pp. 13-69. ISBN 978-1-4020-9412-5
- Kunegis, J. (2014). *Handbook of Network Analysis* [KONECT -- the Koblenz Network Collection]. *arXiv:1402.5500 [physics]*. Obtido de <http://arxiv.org/abs/1402.5500>
- Menzies, F. D., & Neill, S. D. (2000). *Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis*. In *The Veterinary Journal*, 160(2), pp.92–106. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0482>
- Nöremark, M., & Widgren, S. (2014). EpiContactTrace: an R-package for contact tracing during livestock disease outbreaks and for risk-based surveillance. *BMC Veterinary Research*, 10(1), pp.71. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-71>
- OIE. (2009). Bovine Tuberculosis. Em *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017*.

- Oliveira, M., & Gama, J. (2012). An overview of social network analysis: Social network analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery*, 2(2), pp.99–115. <https://doi.org/10.1002/widm.1048>
- Ortiz-Pelaez, A., Pfeiffer, D. U., Soares-Magalhães, R. J., & Guitian, F. J. (2006). Use of social network analysis to characterize the pattern of animal movements in the initial phases of the 2001 foot and mouth disease (FMD) epidemic in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, 76(1–2), pp.40–55. <https://doi.org/10.1016/j.pre-vetmed.2006.04.007>
- Ossada, R. (2015). *Modelagem de medidas de controle em redes de movimentação de animais*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pp. 19- 22
- Palisson, A., Courcoul, A., & Durand, B. (2016). Role of Cattle Movements in Bovine Tuberculosis Spread in France between 2005 and 2014. *PLOS ONE*, 11(3), e0152578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152578>
- Palmer, M. V. (2013). *Mycobacterium bovis*: Characteristics of Wildlife Reservoir Hosts in. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, pp.1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.12115>
- Parsons, S. D. C., Drewe, J. A., Gey van Pittius, N. C., Warren, R. M., & van Helden, P. D. (2013). Novel cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 2004–2007. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130268>
- Perrett, S., Lesellier, S., Rogers, F., Williams, G. A., Gowtage, S., Palmer, S., ... Chambers, M. A. (2018). Assessment of the safety of Bacillus Calmette-Guérin vaccine administered orally to badgers (*Meles meles*). 36(15), pp.1990–1995. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.101>

- Phillips, C. J. C., Foster, C. R. W., Morris, P. A., & Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle in *Research in Veterinary Science*, 74(1), pp. 1–15.
- L. P. Ibarra, M. Quezad, Capítulo 6: Toma y envío de muestras al laboratorio (2004) Plana., M. A. S., & Quezada, M. (2004). *Bases para la inspección de la tuberculosis bovina en matadero*. Concepción, Chile: Servicio Agrícola y Ganadero : Universidad de Concepción, pp.77-81.
- Pollock, J. M., & Neill, S. D. (2002). *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *The Veterinary Journal*, 163(2), pp.115–127.
<https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0655>
- Pollock, J. M., Welsh, M. D., & McNair, J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease in *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1–2), pp.37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.012>
- Quinn, Patrick J. (ED.) - *Mycobacterium* species, in *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2. ed ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-1-4051-5823-7, pp-869-907.
- R. van Crevel, T. H. M. Ottenhoff, & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. in *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp.294–309. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294-309.2002>
- Radhakrishnan, I., K., M. Y., Kumar, R. A., & Mundayoor, S. (2001). Implications of Low Frequency of IS6110 in Fingerprinting Field Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India in *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), pp.1683.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1683.2001>

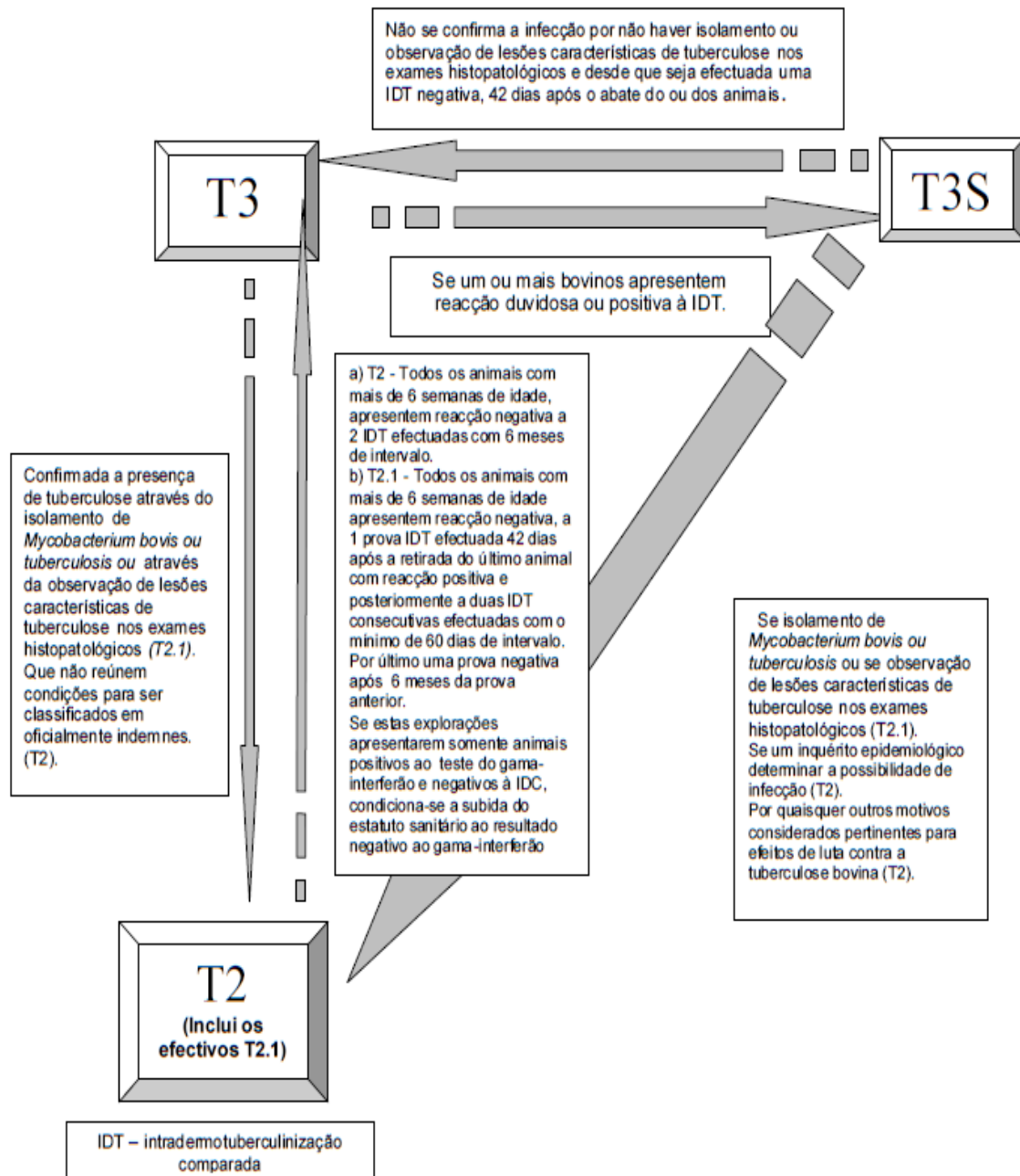
- Rahim, Z., Thapa, J., Fukushima, Y., van der Zanden, A. G. M., Gordon, S. V., Suzuki, Y., & Nakajima, C. (2017). Tuberculosis Caused by *Mycobacterium orygis* in Dairy Cattle and Captured Monkeys in Bangladesh: a New Scenario of Tuberculosis in South Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), pp.1965–1969. <https://doi.org/10.1111/tbed.12596>
- Rivière, J., Carabin, K., Le Strat, Y., Hendriks, P., & Dufour, B. (2014). Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: A survey-based review in *Veterinary Microbiology*, 173(3–4), pp.323–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.013>
- Rodriguez-Campos, S., Smith, N. H., Boniotti, M. B., & Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Veterinary Science*, 97, S5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>
- Roring, S., Scott, A. N., Glyn Hewinson, R., Neill, S. D., & Skuce, R. A. (2004). Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Veterinary Microbiology*, 101(1), pp.65–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.013>
- Roychowdhury, T., Mandal, S., & Bhattacharya, A. (2015). Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep12567>
- Sakamuri, R. M., Moodley, P., Yusim, K., Feng, S. H., Sturm, A. W., Korber, B. T. M., & Mukundan, H. (2015). Current methods for diagnosis of human tuberculosis and considerations for global surveillance. In H. Mukundan, M. A. Chambers, W. R. Waters, & M. H. Larsen (Eds.), *Tuberculosis, leprosy and mycobacterial diseases of man and animals: the many hosts of mycobacteria* Wallingford: CABI. pp. 72–102. <https://doi.org/10.1079/9781780643960.0072>

- Santos, N. G. C. dos. (2016). *Tuberculosis in wild ungulates in the Iberian Peninsula: applying new methods for the epidemiological analysis of intra and interspecies transmission* (doctoral thesis). Universidade do Minho. pp. 8-57.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Almeida, V., & Gortzar, C. (2012). Wildlife Tuberculosis: A Systematic Review of the Epidemiology in Iberian Peninsula. Em M. D. L. Ribeiro De Souza Da Cunha (Ed.). *Epidemiology Insights. InTech*.
<https://doi.org/10.5772/33781>
- Scott, J. (2011). Social network analysis: developments, advances, and prospects. in *Social Network Analysis and Mining*, 1(1), pp.21–26.
<https://doi.org/10.1007/s13278-010-0012-6>
- Shamputa, I. C., Cho, S., Lebron, J., & Via, L. E. (2015). Introduction and epidemiology of iMycobacterium tuberculosis/i complex in humans. In H. Mukundan, M. A. Chambers, W. R. Waters, & M. H. Larsen (Eds.), *Tuberculosis, leprosy and mycobacterial diseases of man and animals: the many hosts of mycobacteria*, Wallingford: CABI pp.1–16.
<https://doi.org/10.1079/9781780643960.0001>
- Shinnick, T. M., & Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
<https://doi.org/10.1007/BF02111489>
- Skuce, R. A., McCorry, T. P., McCarroll, J. F., Roring, S. M. M., Scott, A. N., Brittain, D., ... Neill, S. D. (2002). Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), pp. 519–528. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-519>
- SolaC., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Loch, C., Supply, P., & Rastogi, N. (2003).

- Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 3(2), pp.125–133.
- Songer, J. Glenn, The Genus *Mycobacterium* (2005) in Songer, J. G., & Post, K. W. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders, pp. 401-419.
- Stucki, D., & Gagneux, S. (2013). Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis*, 93(1), pp.30–39. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.11.002>
- Teixeira, H. C., Abramo, C., & Munk, M. E. (2007). Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 33(3), pp.323–334. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132007000300015>
- Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vincent-Lévy-Frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J. L., & Gicquel, B. (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), pp. 2668–2673.
- Tortoli, E., Urbano, P., Marcelli, F., Simonetti, T. M., & Cirillo, D. M. (2012). Is Real-Time PCR Better than Conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), pp.2810–2813. <https://doi.org/10.1128/JCM.01412-12>
- Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M. D., Watanabe, H., Kawakami, K., ... Matsuzaki, G. (2007). IL-17-Mediated Regulation of Innate and Acquired Immune Response against Pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin Infection. *The Journal of Immunology*, 178(6), pp.3786–3796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3786>

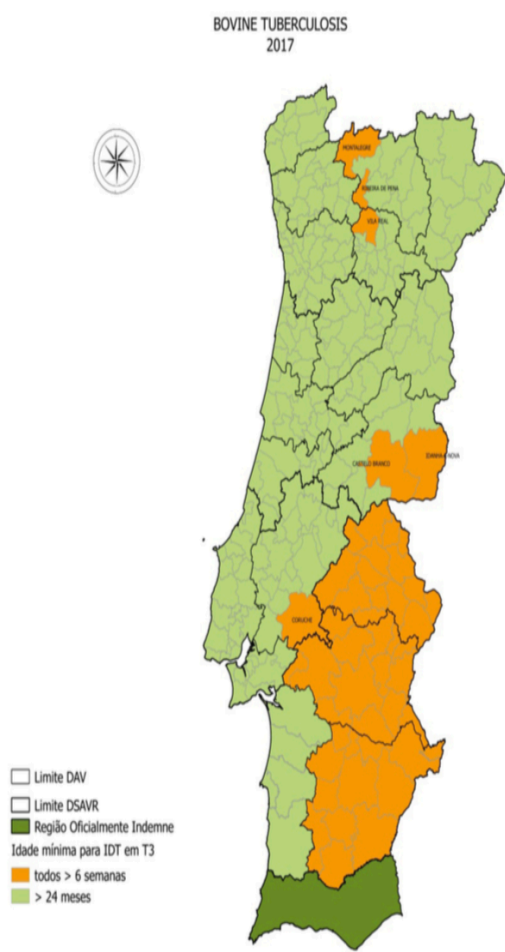
- Vernon, M. C., & Keeling, M. J. (2009). Representing the UK's cattle herd as static and dynamic networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1656), pp.469–476. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1009>
- Vieira-Pinto, M., Alberto, J., Aranha, J., Serejo, J., Canto, A., Cunha, M. V., & Botelho, A. (2011). Combined evaluation of bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Central-East Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 57(6), pp.1189–1201. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0532-z>
- Vordermeier, H. M., Jones, G. J., Buddle, B. M., Hewinson, R. G., & Villarreal-Ramos, B. (2016). Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), pp.87–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111311>
- Warren, R. M., Streicher, E. M., Sampson, S. L., van der Spuy, G. D., Richardson, M., Nguyen, D., ... van Helden, (2002). Microevolution of the Direct Repeat Region of *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for Interpretation of Spoligotyping Data. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), pp.4457–4465. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4457-4465.2002>
- WHO. (2017). *Global Tuberculosis Report 2017*. <https://doi.org/WHO/HTM/TB/2017.23>
- WHO, FAO, & OIE. (2017). *Roadmap for Zoonotic Tuberculosis*
- Winglee, K., Manson McGuire, A., Maiga, M., Abeel, T., Shea, T., Desjardins, C. A., ... Bishai, W. R. (2016). Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium africanum* Strains from Mali Provides Insights into the Mechanisms of Geographic Restriction. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004332>

ANEXO I



ANEXO II

Reproduction holdings



Fattening holdings

